CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE QUELQUES PROBLÈMES POSÉS PAR LA MULTIPLICATION DU VIRUS DE LA MOSAIQUE DU TABAC

PAR

L. HIRTH

SOMMAIRE

INTRODUCTION 50

PREMIÈRE PARTIE. — **Matériel et techniques** 52

CHAPITRE I. — Matériel et techniques virologiques 52

CHAPITRE II. — Les techniques de purification des virus des plantes ... 61

CHAPITRE III. — Les techniques biologiques 63

CHAPITRE IV. — Techniques diverses 69

CHAPITRE V. — Recherches sur les techniques de purification et de titrage du V.M.T. 72

DEUXIÈME PARTIE. — **Recherches sur la multiplication du V.M.T. dans divers types de tissus de Tabac** 84

CHAPITRE I. — Physiologie du matériel expérimental 84

CHAPITRE II. — Multiplication du virus de la mosaïque du Tabac en culture de tissus et en disques de feuilles : résultats expérimentaux. 96

TROISIÈME PARTIE (*). — **Étude des problèmes posés par la virulence du V.M.T. et ses variations** 133

CHAPITRE I. — Virulence comparée du V.M.T. des cultures de tissus et des feuilles 134

CHAPITRE II. — La virulence du V.M.T. et les problèmes des inhibitions d'infection 136

CHAPITRE III. — Pouvoir pathogène et intégrité des fractions protéique et ribonucléique du V.M.T. 141

CHAPITRE IV. — Structures comparées du V.M.T. des cultures et du V.M.T. des feuilles 146

QUATRIÈME PARTIE. — **Conclusions** 152

SUMMARY 158

BIBLIOGRAPHIE 159

(*) La troisième et la quatrième partie seront publiées dans le fascicule suivant. *Rev. Path. Vég. Ent. Agr. Fr.* 1960, *XXXIX* (3).

REVUE DE PATHOLOGIE VÉGÉTALE
ET D'ENTOMOLOGIE AGRICOLE DE FRANCE
T. XXXIX - N° 2 - AVRIL-JUIN 1960.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE QUELQUES PROBLÈMES POSÉS PAR LA MULTIPLICATION DU VIRUS DE LA MOSAIQUE DU TABAC

PAR

L. HIRTH

INTRODUCTION

La nature même des virus implique, pour ceux-ci, l'existence de liens particulièrement étroits avec la cellule qui les héberge.

Il semble logique d'admettre que certains aspects de la physiologie de cette dernière puisse retentir sur le comportement du parasite. Or, au moment où nous avons entrepris ce travail (1949) il est apparu que ce problème, du moins pour les virus des plantes, n'avait guère été abordé que sous l'angle de la pathologie. Il pouvait être intéressant d'envisager les modalités de la multiplication d'un virus convenablement choisi en fonction du comportement physiologique des cellules parasitées. On pourrait ainsi mettre en évidence d'éventuelles différences dans la multiplication des virus des végétaux et pénétrer plus profondément dans l'intimité du mécanisme de celle-ci.

D'autre part, si nous observions, dans nos conditions expérimentales, des variations dans le pouvoir pathogène du virus étudié, nous pourrions aborder les problèmes relatifs à son pouvoir pathogène.

Pour réaliser ce travail nous sommes partis d'une observation faite dès 1948 par SEGRETAIN. Celui-ci avait montré que la multiplication du virus de la mosaïque du Tabac (V.M.T.) dans des fragments de tiges de Tabacs virosés, mis en survie dans un milieu gélosé à base de Knop saccharosé et contenant de l'acide indole acétique (A.I.A.) se poursuivait sur un rythme assez lent mais régulier pendant douze à treize mois. Ainsi apparaissait un mode de multiplication du V.M.T. qui semblait différent de celui que l'on connaissait depuis longtemps dans les feuilles. Ce fait devait être précisé par AUGIER DE MONTGREMIER et MOREL (1948), qui montrèrent que les cultures virosées de

tissus accoutumés de Tabac contenaient beaucoup moins de virus que les plantes correspondantes; les auteurs voyaient là une compétition entre la multiplication du virus et celle des cellules, mais ils se bornaient à faire une constatation et à formuler une hypothèse. L'aspect particulier de la multiplication du V.M.T. dans les cultures de tissus nous a semblé un moyen commode d'aborder l'étude des diverses modalités de cette multiplication, et de voir si, à des rapports éventuels nouveaux se formant entre cellule et virus, ne correspondaient pas des modifications du comportement de ce dernier.

Cependant, la compréhension des faits, que nous pouvions éventuellement mettre en évidence, impliquait la comparaison des résultats à ceux obtenus avec un matériel dans lequel la multiplication du V.M.T. s'effectuerait d'une façon différente. Nous pouvions certes choisir les plantes entières, mais si celles-ci représentent un matériel physiologiquement très intéressant, les résultats contradictoires auxquels leur étude, à propos de la multiplication du V.M.T., a donné naissance (cf. 2e partie, chap. II) ne nous ont pas incité à les employer; d'autre part, l'hétérogénéité des tissus et des organes qui constituent une plante n'est pas favorable à la comparaison avec les cultures de tissus qui représentent un matériel relativement homogène. Il était préférable d'utiliser les disques de feuilles de Tabac, qui avaient été employés assez peu jusque-là, dans des études de ce genre (Takahashi, 1947). Mais, pour que la méthode comparative employée soit valable, il fallait pouvoir utiliser des critères communs aux deux types de matériels dont nous comptions user; c'est ainsi que nous avons envisagé d'étudier les liens unissant la multiplication du V.M.T. et les variations de certains constituants biochimiques cellulaires.

En culture de tissus, peu de travaux ont été effectués à ce sujet, par contre un certain nombre de recherches ont été entreprises tant sur des plantes entières que sur des disques de feuilles; mais aucune des publications, auxquelles il sera fait allusion dans le cours de ce mémoire, n'ont été effectuées dans le but de saisir les diverses modalités des liens virus-cellule.

Le sujet choisi nous a ainsi conduit à aborder la plupart des problèmes de la virologie.

Notre travail comporte trois parties essentielles. Au cours de la première partie, nous avons décrit le matériel et les techniques utilisés, ainsi que les recherches personnelles relatives au titrage et à la purification du V.M.T.; dans la seconde partie nous avons abordé, outre une étude préliminaire des caractères physiologiques du matériel utilisé, des problèmes relatifs aux modalités de la multiplication du V.M.T., aux liens virus-cellule, aux mécanismes intimes de la multiplication du virus. La troisième partie est consacrée à la recherche des causes de la variabilité chez le V.M.T. et à la responsabilité de ses fractions constitutives dans le pouvoir pathogène.

PREMIÈRE PARTIE

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

CHAPITRE PREMIER

MATÉRIEL ET TECHNIQUES VIROLOGIQUES

A. Matériel

Le V.M.T. étant le plus commode des virus des plantes, c'est lui que nous avons employé. La souche de virus de la mosaïque du tabac que nous avons utilisée nous a été remise par G. SEGRETAIN qui la conservait depuis 1942. Nous n'avons jamais introduit au laboratoire d'autres souches de V.M.T. et nous avons pris les précautions classiques afin d'éviter l'introduction d'un contaminant quelconque : en particulier les insectes pouvant être présents dans la serre sont régulièrement détruits par des fumigations d'Hexavap. La souche utilisée est facilement identifiable, car en dehors de la mosaïque de type classique elle provoque des déformations importantes des feuilles jeunes des Tabacs qu'elle infecte. Au cours des neuf années durant lesquelles nous l'avons utilisée, nous n'avons pas constaté de variation de cette souche dans la symptomatologie, la microscopie électronique ou le pouvoir infectieux vis-à-vis de *N. glutinosa* qui puisse nous faire soupçonner des changements quelconques en dehors de ceux que nous aurions systématiquement cherché à provoquer.

La souche est conservée en effectuant des passages successifs sur des Tabacs de la variété P. 19 de Bergerac, tous les trois mois en moyenne, ce délai pouvant être beaucoup plus bref suivant les nécessités expérimentales.

B. Méthodes de titrage des virus des plantes

Le travail que nous avons entrepris exige non seulement la comparaison des teneurs en virus des témoins et des traités d'une série donnée, mais encore une évaluation quantitative précise et commode. La technique de titrage utilisée conditionnera donc la technique de

purification employée. Nous commencerons par exposer rapidement les divers types de techniques de titrage des virus et particulièrement du V.M.T. afin d'en donner une revue critique et d'exposer ainsi les raisons qui nous ont conduit à choisir tel procédé plutôt que tel autre.

1° Les techniques physico-chimiques comportent :

a) Les méthodes de comptage des particules.

b) L'évaluation du titre en virus d'une suspension par son poids sec.

c) L'emploi de techniques microchimiques pour l'évaluation de la teneur en virus.

d) Les techniques colorimétriques dont la principale est l'utilisation pour le titrage du V.M.T. de la réaction de Folin (1927) qui a été décrite par Commoner et *al.* (1950).

e) Le titrage du V.M.T. par la mesure de la densité optique des solutions dans l'U.V.

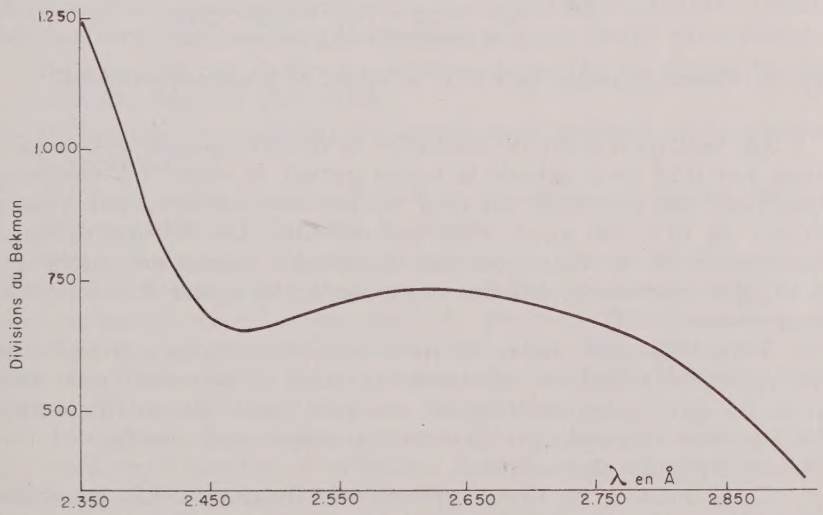


Fig. 1 : Spectre d'absorption dans l'U.V. d'une suspension de V.M.T. purifié.

La spectrophotométrie a été utilisée pour la première fois par Loring et Stanley (1937) pour déterminer le spectre d'absorption du V.M.T. Plus tard, Takahashi (1951) a mis au point une technique de titrage du V.M.T. par spectrophotométrie. Nous avons repris le travail de Takahashi. Nous sommes parti d'une suspension de V.M.T. purifié (cf. chapitre II). La teneur en virus de la suspension a été estimée par le poids sec, l'azote et le phosphore. Les trois modes d'évaluation,

dont chacun a fait l'objet d'au moins trois mesures, se sont recoupés et ont donné une estimation moyenne de 2,56 mg de virus par millilitre de suspension. A partir de la solution mère on effectue des dilutions et on évalue leur densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre. La figure 2 résume les résultats.

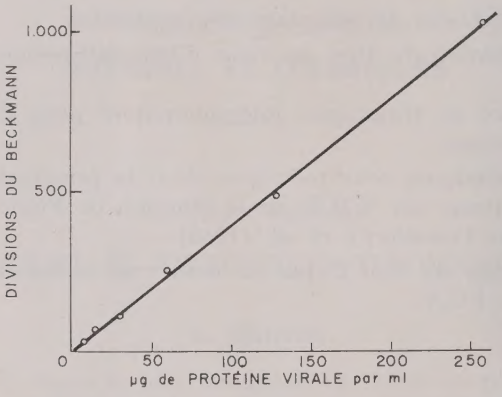


FIG. 2 : Courbe de titrage du V.M.T. au moyen de la spectrophotométrie.

On voit qu'il suffit de multiplier la densité optique des suspensions par 0,25 pour obtenir la concentration en virus. On remarque que, par cette technique, on peut évaluer commodément par mesure directe de 10 à 300 µg de virus par millilitre. Les densités optiques que nous avons trouvées pour des teneurs des suspensions inférieures à 10 µg n'ont pas été suffisamment reproductibles pour être acceptées sans réserve.

Dans l'ensemble, notre courbe a une pente un peu plus grande que celle de TAKAHASHI : ce dernier obtenait un peu plus de 30 divisions du spectrophotomètre pour 10 µg de virus par millilitre, mais les procédés employés par l'auteur américain pour purifier le virus étaient différents des nôtres.

Cette méthode de titrage présente des avantages. Elle est moins complexe que la plupart des méthodes chimiques, elle est précise et donne des résultats reproductibles, elle convient parfaitement à des travaux exigeant de très nombreux titrages; mais elle implique par contre qu'aucune substance absorbant à 2 650 Å ne vienne interférer avec le virus au cours des phénomènes d'absorption. En effet, SCHLEGEL et RAWLINS (1953) ont montré que si la technique de purification employée n'était pas correcte, les résultats pourraient être faussés par la présence de substances parasites absorbant dans l'U.V. Ainsi, la méthode de purification utilisée devra non seulement convenir à la méthode de titrage finalement choisie, mais encore être la meilleure

en valeur absolue. On conçoit qu'il est de toute façon extrêmement important de vérifier par d'autres techniques les résultats obtenus à l'aide de la méthode habituelle de dosage du virus. C'est pourquoi, bien qu'ayant adopté la méthode spectrophotométrique, nous avons très souvent vérifié nos résultats par l'un ou l'autre (parfois les deux ensemble) des procédés mettant en jeu des techniques biologiques.

2° Les techniques biologiques.

Elles sont peu nombreuses mais fort importantes car elles ont représenté longtemps et représentent encore pour certains virus l'unique moyen de comparer la concentration de différents jus virosés. Elles ont donné lieu à des recherches nombreuses.

a) *La méthode des lésions locales.*

Holmes (1928) qui avait découvert l'utilisation des infections systémiques pour le titrage des virus des plantes, créa la virologie quantitative lorsqu'il découvrit en 1929 que le nombre des lésions locales sur les feuilles de certaines variétés de Tabacs, frottées avec des jus virosés, était proportionnel à la concentration en virus. Depuis la découverte fondamentale de Holmes, on s'est efforcé entre autres :

— De découvrir des plantes susceptibles de donner des lésions locales avec les virus les plus variés;

— De préciser les conditions de validité de la méthode et d'améliorer la technique;

— D'étudier les facteurs modifiant la formation des lésions locales et susceptibles d'influer sur le titrage.

Parmi les plantes capables de fournir des lésions locales avec le V.M.T. (cf. Bawden *in* « Plant virus and virus diseases », 1953) trois sont particulièrement intéressantes : *N. glutinosa*, *Datura stramonium* et *Phaseolus vulgaris*. Nous avons utilisé les deux premières car, bien que *Phaseolus vulgaris* présente d'indiscutables avantages de culture, il répond moins bien aux inoculations.

L'emploi de la technique systématique des lésions locales soulève un assez grand nombre de difficultés dont les unes sont d'ordre fondamental et les autres d'ordre pratique.

Pour les difficultés d'ordre fondamental, Holmes avait vu d'emblée que le nombre de lésions fournies par un même inoculum variait d'une plante à l'autre, d'une feuille à l'autre, d'où la nécessité d'un grand nombre de mesures dans le cas où l'on compare deux inoculum. Samuel et Bald (1933), en remarquant que les parties opposées de la même feuille répondaient à l'inoculation d'une manière très voisine, ont amélioré la technique de Holmes (Samuel et *al.*, 1935). Il suffit d'inoculer la moitié gauche de la feuille avec un jus n° 1 par exemple et la moitié droite avec un jus n° 2 pour que la comparaison soit valable. Il suffit de répéter l'opération sur un nombre

de feuilles suffisant (10 à 20 en moyenne) en prenant soin de faire alterner le côté des feuilles qui sera inoculé avec chacun des jus pour que l'on puisse obtenir des résultats interprétables. Nous avons toujours utilisé cette technique, la préférant à celle du carré latin préconisée par YOUDEN et BEALE (1934), YOUDEN et *al.* (1935). Cependant, si l'on inocule les deux moitiés de la même feuille avec le même inoculum on trouve une certaine dispersion du nombre des lésions : l'inoculation n'a pas été identique sur les deux côtés. En effet, le nombre des lésions dépend non seulement de la concentration en virus, de l'état physiologique des feuilles inoculées, etc., mais encore de la manière dont le jus virosé a été frotté sur la feuille.

Une autre difficulté fondamentale de la technique des lésions locales est de ne pouvoir appliquer avec certitude l'analyse statistique des résultats obtenus. En effet, les lésions ne sont pas distribuées d'une façon normale par demi-feuille, elles varient grandement de feuille à feuille de la même plante, de plante à plante, c'est pourquoi KLECSKOWSKI (1950) a tenté de transformer les résultats obtenus en introduisant un paramètre convenablement choisi de telle manière que les nombres transformés puissent être étudiés par la technique statistique ordinaire (séries de Poisson). L'inconvénient de ce système est d'exiger un assez grand nombre d'expériences afin de calculer d'une façon valable le paramètre C de l'équation de transformation $y = \log (X + C)$ où X est le nombre de lésions trouvé et C le paramètre à chercher. Récemment, HART et PEREZ-MENDEZ (1957) ont mis au point une technique n'exigeant pas la transformation de KLECZKOWSKI pour interpréter les résultats obtenus par la technique des lésions locales; mais le nombre des mesures à effectuer reste considérable et la technique n'a toujours qu'une valeur comparative.

On comprendra alors facilement que nous ayons renoncé à utiliser cette technique pour l'évaluation quantitative du virus de nos jus, d'autant plus qu'on mesure ainsi la virulence du jus et non pas la quantité de nucléoprotéine virale présente. Certes, la plupart du temps il y a un rapport étroit entre les deux, mais cela n'est pas obligatoire.

Cependant, cette technique peut être commode pour comparer entre eux des jus, à la condition :

1° Que la concentration des jus utilisés soit située dans la partie de la courbe où il y a proportionnalité entre la concentration en virus et le nombre des lésions obtenues;

2° Que la différence de concentration entre des jus testés soit au moins de 30 %. Si beaucoup d'auteurs pensent que l'on ne peut obtenir des différences significatives du nombre des lésions si les jus comparés ne diffèrent pas au moins de 40 % par leur teneur en virus, LORING (1937) croit qu'on peut obtenir une précision de l'ordre de 10 % et PRICE et SPENCER (1955), SPENCER et PRICE (1943), PRICE

(1945) ont confirmé ce point de vue. Cependant, pour mettre en évidence une aussi faible différence, il convient d'utiliser au moins 36 plantes pour chaque essai.

Nous n'avons utilisé la méthode des lésions locales que pour vérifier les résultats obtenus par d'autres techniques. Par contre, nous l'avons systématiquement employée pour évaluer les variations de virulence de suspensions déterminées.

Voici comment nous avons procédé : des Tabacs du genre *Nicotiana glutinosa* ou des *Datura stramonium* sont cultivés dans la serre de l'institut Pasteur à 20 °C. Ils sont maintenus la nuit sous un éclairage artificiel type lumière du jour jusqu'à ce qu'ils présentent des feuilles suffisamment grandes. Ils sont ensuite disposés en dehors de l'éclairage artificiel.

Lors d'une expérience, les *N. glutinosa* utilisés proviennent toujours d'un lot dont tous les sujets ont été semés et repiqués en même temps et sont âgés de deux à trois mois suivant les circonstances. Au moment de leur utilisation les plantes ont en moyenne 20 cm de haut, n'ont pas encore formé leur hampe florale et comportent 4 à 5 feuilles utilisables, c'est-à-dire ayant au moins 10 cm de long et 6 à 7 cm de large et ne présentant ni nécrose, ni symptôme de jaunissement, ni lésion d'aucune sorte. Vingt-quatre heures avant leur emploi, les Tabacs sont étêtés et les feuilles utilisables sont seules laissées sur la plante. Pour comparer deux jus on prend un nombre suffisant de plantes pour avoir en tout au moins 10 feuilles. On inocule chaque jus de manière à ce qu'il occupe alternativement la partie droite et la partie gauche de chacune des demi-feuilles inoculées. L'inoculation se fait avec l'index droit, la feuille étant soutenue par une gaze tenue de la main gauche. On s'efforce d'inoculer des surfaces identiques pour chacune des demi-feuilles. Nous n'avons pratiquement jamais utilisé d'abrasifs dans ce genre de titrage car s'ils accentuent la sensibilité de la méthode, ils augmentent aussi l'erreur standard.

Dans chaque expérience une dizaine de feuilles sont inoculées avec le même jus sur les deux moitiés correspondantes afin de déterminer la dispersion du nombre des lésions. L'interprétation des résultats est faite ensuite en tenant compte de la dispersion du nombre des lésions qui est exprimée par le rapport :

$$\frac{\text{Nombre de lésions du côté droit de la feuille}}{\text{Nombre de lésions du côté gauche de la feuille}}$$

et en utilisant la méthode statistique classique.

b) *La technique sérologique.*

Depuis que Purdy Beale (1928, 1931) a montré la présence d'antigène spécifique dans les Tabacs infectés par le V.M.T., de nombreux travaux (Gratia, 1933, Birkeland, 1934, Chester, 1935) ont

été entrepris aussi bien sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif.

La sérologie des virus n'est qu'un chapitre de la sérologie générale. Voici quels sont les principaux tests sérologiques utilisés :

— La réaction de *précipitation* (cf. MATTHEWS, 1957).

— La réaction de *fixation du complément* (cf. BOYD, 1947).

— La technique *anaphylactique*. Elle a été employée par SEASTONE, LORING et CHESTER (1937). Ils montrèrent qu'elle était pratiquement inutilisable pour des évaluations quantitatives.

— La technique d'*inactivation de la virulence* par le sérum de lapin contenant les anticorps correspondants BEALE (1928), MATSUMOTO (1930), SILBERSCHMIDT (1933), SPOONER et BAWDEN (1935), RAPPAPORT et SIEGEL (1954).

UTILISATION PRATIQUE DE LA MÉTHODE DE PRÉCIPITATION

La méthode du point de dilution maxima.

Elle consiste à mettre en contact des dilutions connues et de plus en plus fortes, d'une suspension de virus avec une dilution constante de sérum contenant les anticorps correspondants. On cherche au bout de vingt-quatre heures de contact la dilution maxima pour laquelle on obtient encore un précipité. Si on compare deux suspensions de V.M.T. par exemple, et si la première donne encore une précipitation pour la dilution limite de 1/32 et la seconde pour la dilution limite de 1/128, on en conclura que la seconde suspension contient quatre fois plus de virus que la première.

Cette méthode ne permet de détecter avec certitude que des différences de concentration supérieures à 50 %. Des améliorations de la méthode ont permis d'augmenter sa précision. Citons : la micro-méthode sérologique mise au point par LIMASSET et AUGIER DE MONTGREMIER (1947), l'estimation de la concentration par l'évaluation du temps de précipitation (MATTHEWS, 1957), une méthode de chromatographie sérologique (MATTHEWS, 1957). Cependant, il est difficile, quel que soit le procédé employé, de mettre en évidence des différences de concentrations en virus inférieures à 30 %.

Le sérum anti-V.M.T. a été obtenu à l'aide de lapin en utilisant les techniques décrites par de nombreux auteurs.

Les sérums récoltés peuvent être additionnés de quelques gouttes de merthiolate à 2 % afin d'éviter le développement des bactéries qui auraient pu se glisser au cours des opérations de récolte du sérum. Les sérums sont conservés à la glacière ou au conservateur à — 15 °C. Ils sont utilisables pendant de nombreux mois. Leur taux en anticorps ne diminue pas sensiblement.

La réaction de précipitation.

Un certain nombre de précautions doivent être prises :

1° *La réaction n'est convenable que pour certaines valeurs du rapport antigène/anticorps.* Si le sérum est trop riche en anticorps la réaction se fait mal, ou est retardée. Il convient souvent de diluer le sérum. En général, nous l'avons dilué au 1/10; cette dilution doit être effectuée avec une solution de chlorure de Na à 9 °/₀₀; la réaction antigène-anticorps ne peut s'effectuer qu'en présence d'électrolytes : le chlorure de sodium est celui qui convient le mieux.

2° *La réaction n'a lieu que pour une concentration minima en antigène :* c'est le principe même de la technique du point de dilution maxima, c'est cette concentration minima qui est également l'expression même de la sensibilité de la méthode. Il est donc évident qu'on ne pourra pas comparer des suspensions dont les concentrations en V.M.T. seraient trop faibles (on admet qu'on obtient encore une précipitation pour une teneur en virus de 5 µg par millilitre).

3° *Réalisation pratique du titrage :* on met dans des tubes à hémolyse 1 ml de sérum anti-V.M.T. dilué au 1/10; pour chaque suspension de virus il y a autant de tubes à hémolyse que de dilutions prévues. Ces suspensions sont diluées extemporanément. Les dilutions se font de 2 en 2, c'est-à-dire au 1/2, au 1/4, au 1/8, au 1/16, etc. Dans la plupart des cas nous avons poursuivi la dilution des jus testés jusqu'à 1/1024 du jus initial afin d'être sûr de nous trouver dans une zone où la concentration du V.M.T. était trop faible pour provoquer une précipitation, et d'inclure ainsi dans nos dilutions la concentration minima de précipitation. Un millilitre de chaque dilution est ajouté au sérum anti-V.M.T., les tubes sont disposés dans des portoirs convenables et portés dans un bain-marie thermostatique maintenu à 40 °C pendant deux heures, puis abandonnés ensuite à la température du laboratoire pendant vingt-quatre heures. Pendant les cinq premières heures, les lectures sont effectuées toutes les heures et on note les tubes dans lesquels le précipité apparaît. Ce précipité est examiné à la loupe et son intensité exprimée par un plus ou moins grand nombre de signes +. Après vingt-quatre heures on connaîtra la dilution maxima pour laquelle on obtient encore une précipitation.

Malgré son extrême sensibilité et sa spécificité, la méthode sérologique n'est pas à l'abri de toute critique. En effet, si le point de dilution maxima ne dépend que de la concentration de la suspension étudiée en virus pour les virus de type sphérique (Bushy-Stunt de la Tomate et mosaïque jaune du Navet), Bawden et Pirie (1945) ont montré que dans le cas du V.M.T. le degré d'agrégation des particules virales pouvait modifier la précipitation, le virus agrégé donnant un précipité pour une dilution plus forte que celle donnée par une suspension de virus non agrégé de même concentration. Or, les cultures

de tissus semblent donner un virus s'agrégeant plus facilement que celui des feuilles. D'autre part, Bawden et Kleczkowski (1941) ont montré que certains virus stables chauffés à 60 °C peuvent donner, en présence de protéines non spécifiques, des complexes qui interfèrent avec la précipitation du virus. Ces faits ont été nettement établis pour le virus du Bushy-Stunt, par Bawden et Pirie (1944), pour la jaunisse de la Betterave par Kleczkowski et Watson (1944). Or, nous avons découvert que les cultures de tissus de Tabac contiennent une substance ultra-centrifugeable qui peut ainsi fausser la réaction de précipitation. Enfin, la réaction sérologique peut se produire avec des protéines voisines du V.M.T., mais dépourvues de pouvoir pathogène. En effet, Takahashi et Ishii (1952-1953) puis Commoner et Rodenberg (1955), Commoner et Yamada (1955), Bawden et Pirie (1956) ont isolé des plantes virosées et étudié des substances protéiques ayant des caractères voisins de ceux du V.M.T. mais dépourvues de virulence et précipitant avec un sérum anti-V.M.T. Il n'y a donc pas forcément de relations rigoureuses entre le pouvoir infectieux d'un jus et son pouvoir précipitant.

Toutes ces considérations ont fait que, pour le but que nous nous sommes proposé, nous avons surtout utilisé la technique sérologique à titre de vérification.

En conclusion, il ressort des considérations précédentes :

1° Que la technique spectrophotométrique est la plus rapide, la plus précise, donc la plus commode, bien qu'elle exige une purification assez poussée du virus; cette purification est évidemment l'occasion de pertes mais qui peuvent rester faibles si on prend quelques précautions élémentaires;

2° Qu'il est impossible d'appliquer une technique de titrage qui permettre d'évaluer avec une coïncidence parfaite le pouvoir infectieux, le pouvoir précipitant et la quantité de matériel viral sans aucune cause d'erreur. On devra donc vérifier le degré de correspondance existant entre les trois méthodes envisagées d'évaluation du V.M.T. C'est l'objet des recherches exposées à la fin de la première partie de ce mémoire;

3° Que la précision du titrage d'un virus dépend, en grande partie, du degré de pureté dans lequel il se trouve dans les préparations étudiées : l'isolement du virus en vue du titrage apparaît comme une opération fondamentale. Il faudra donc trouver la méthode de purification du V.M.T. la mieux adaptée à la technique de dosage que nous avons choisie, c'est-à-dire : la spectrophotométrie.

Chapitre II

LES TECHNIQUES DE PURIFICATION DES VIRUS DES PLANTES

Il est évident que le terme de « virus purifié » prend un sens différent suivant le point de vue qui préoccupe celui qui l'emploie. Pour le chimiste, un virus pur aura des caractères chimiques parfaitement constants, pour le physicien les particules isolées auront une forme et des dimensions homogènes, pour le biologiste ce sera une préparation de virulence constante et élevée. Le virus idéalement purifié serait celui qui présenterait une identité absolue de ses particules en dimensions, composition chimique et activité biologique. Il est évident qu'un tel virus n'existe pas et que le degré de pureté d'une suspension sera estimé en fonction de l'usage qu'on désire en faire. En ce qui concerne notre travail, nous avons cherché à purifier le V.M.T. en vue de son titrage par spectrophotométrie. Nous nous sommes attaché à obtenir un virus aussi dépourvu que possible d'éléments contaminants provenant des constituants normaux de la cellule; la méthode utilisée devait par ailleurs occasionner aussi peu de pertes que possible.

Les principales techniques de purification appartiennent à trois grands types. Les techniques purement chimiques, les techniques purement physiques et les techniques hybrides.

1° *Les techniques chimiques.* Elles sont assez variées mais procèdent toutes des principes mêmes de la chimie des protéines. Ainsi, l'addition de sels très solubles et fortement concentrés provoque le « salting out » c'est-à-dire la précipitation des protéines pour une concentration déterminée de sel, celle-ci varie suivant la protéine qu'on veut obtenir. Pour le V.M.T., par exemple, la précipitation est obtenue pour une concentration en $SO_4(NH_4)^2$ égale au tiers de la saturation. C'est un procédé couramment employé.

On peut aussi obtenir la précipitation d'une protéine en l'amenant au pH où elle est le moins soluble : ce pH coïncide généralement avec son point isoélectrique, dans le cas du V.M.T. il est égal à 3,3. On peut d'ailleurs combiner les deux méthodes.

Ces techniques chimiques ne sont pas rigoureusement spécifiques du virus étudié et l'on peut en même temps que celui-ci précipiter des protéines normales de l'hôte; elles nécessitent donc une élimination préalable de ces dernières, qui peut se faire avec le phosphate diso-

dique ou la chaleur. Enfin, l'emploi des sels ou des acides dilués oblige à une dialyse afin d'éliminer les sels qui peuvent gêner la spectrophotométrie ou fausser les titrages biologiques ou sérologiques.

2° *Les techniques physiques* utilisent les propriétés qu'ont les virus en général, et le V.M.T. en particulier, d'avoir un poids moléculaire élevé et de pouvoir sédimenter sous l'influence d'une force centrifuge convenable. Les centrifugations alternées à haute et à basse vitesse ont été utilisées par de nombreux auteurs : Lauffer (1938), Bawden et Pirie (1937), Loring (1938), etc. L'avantage de cette technique réside dans le fait que le virus ainsi traité ne subit pas d'injure chimique mais l'ultra-centrifugation ne favorise pas la dissociation des complexes entre le V.M.T. et les protéines normales de l'hôte, et elle peut provoquer également des modifications dans le comportement des particules, notamment une agrégation (Bawden et Pirie, 1937; Loring, Lauffer, Stanley, 1938).

L'ultra-centrifugation a l'avantage d'être simple et de nécessiter un nombre restreint de manipulations : elle convient donc parfaitement au but que nous nous sommes fixé : le problème est de savoir si elle est rigoureusement spécifique et si des substances normales de la plante ne sédimentent pas en même temps que le virus. Il s'agit également de savoir quelle influence l'agrégation des particules peut avoir sur la virulence et le comportement sérologique du virus.

3° *Les techniques hybrides.* Les différences de solubilité du V.M.T. et des constituants cellulaires dans des émulsions de liquides peu ou pas miscibles les uns dans les autres ont été également utilisées. Steere (1953) a purifié le virus de la nécrose annulaire du Tabac avec une émulsion de butanol dans l'eau. Tandis que Schneider (1953) emploie une émulsion chloroforme-eau, Porter (1956) utilise avec succès les propriétés de certains fluorocarbones (génétron-fréon) pour purifier le V.M.T. et le virus de la nécrose du Tabac. Quels que soient les procédés employés, on centrifuge les émulsions qui se séparent en plusieurs couches, le V.M.T. restant toujours en suspension dans la phase aqueuse qu'il suffit de recueillir et à laquelle on fait subir une ultra-centrifugation. Porter (1956) a montré qu'en utilisant les fluorocarbones, la virulence des suspensions était particulièrement élevée et le degré de pureté du virus isolé très grand; les fluorocarbones éliminent très bien les fractions protéiques normales des plantes.

Chapitre III

LES TECHNIQUES BIOLOGIQUES

I. La technique des cultures de tissus

Comme nous l'avons vu, les cultures de tissus devaient nous permettre d'aborder les problèmes relatifs aux liens éventuels unissant la multiplication du V.M.T. et la multiplication cellulaire. Nous avons tenu à isoler nous-mêmes les souches de cultures de tissus de Tabac que nous avons utilisées.

Nous ne décrirons dans ce chapitre que les faits essentiels : la technique des cultures de tissus étant bien connue et ayant fait, depuis sa mise au point par Gautheret (1939) et White (1939), l'objet de travaux nombreux.

Les diverses souches de tissus de Tabac utilisées au cours de ce travail : leur obtention, leurs caractères

1° Technique générale.

Nous avons utilisé dans ses grandes lignes la méthode décrite par Gautheret dans son manuel technique de culture des tissus végétaux (1942) et nous nous sommes inspiré des résultats obtenus par Morel (1948).

2° Obtention des souches.

Les milieux de base utilisés sont ceux préconisés par Gautheret, c'est-à-dire solution de Knop diluée au demi, additionnée de glucose ou de saccharose suivant les cas et contenant 10 gouttes de solution de Berthelot par litre, de l'aneurine à la concentration de 10^{-6}, du chlorhydrate de cystéine à 10^{-5} et 12 g de gélose par litre. Suivant les circonstances expérimentales, de l'acide indole acétique ou naphtalène acétique peut être ajouté au milieu.

a) *Les tissus de Crown-Gall.*

Des Tabacs de la variété P 19 de Bergerac, cultivés dans la serre de l'Institut Pasteur et âgés d'un à deux mois, sont inoculés avec une souche d'*Agrobacterium tumefaciens ;* on pratique généralement, avec une aiguille, plusieurs inoculations sur la même tige : on les espace les unes des autres de 2 à 3 cm. Les tumeurs se développent lentement et mettent parfois plusieurs mois à atteindre un volume suffisant. Elles sont constituées par une agglomération de fragments

plus ou moins distincts les uns des autres et présentent parfois des formations foliaires très nettes; les tumeurs ainsi obtenues sont toujours vertes. Lorsqu'elles ont atteint un volume suffisant, voisin de celui d'une petite prune, elles sont prélevées, et mises en culture suivant la technique classique de GAUTHERET. Les cultures sont disposées à la lumière diffuse; un mois et demi à deux mois après l'isolement, le premier repiquage est effectué. Les autres repiquages se succèdent tous les deux ou trois mois suivant les nécessités expérimentales.

b) *Les tissus accoutumés.*

Il n'est pas possible d'obtenir des tissus normaux de Tabac, par contre le phénomène de l'accoutumance (anergie) a été étudié en détail par GAUTHERET et les tissus de Tabac accoutumés ont été obtenus par MOREL (1948). Leurs caractères ont été précisés par LIMASSET et GAUTHERET (1950). Nous inspirant des remarques de MOREL (1948), nous avons obtenu après un certain nombre d'essais infructueux, une souche de tissus accoutumés de Tabac. Cette souche pousse bien sur un milieu de base additionné de saccharose à 3,5 % et ne contenant pas d'acide indole acétique. Elle a un aspect analogue à celle que nous a remise le professeur GAUTHERET.

c) *L'utilisation du lait de coco.*

De nombreux auteurs ont montré que le lait de coco favorisait la croissance de certains embryons immatures, CAPLIN et STEWARD (1948), GAUTHERET (1952), DUHAMET (1949-1952) ont indiqué l'importance du lait de coco dans l'accélération et même dans le déclenchement de la croissance des tissus végétaux cultivés *in vitro*. Nous avons utilisé cette propriété du lait de coco à la fois pour accélérer la croissance des souches proliférant déjà sur milieu normal et pour obtenir plus facilement de nouvelles souches.

Dans les deux cas, les colonies étaient repiquées sur un milieu à 5, 10 ou 15 % de lait de coco, suivant les circonstances expérimentales, elles ont proliféré activement et ont pû être repiquées très régulièrement.

Cependant, nous avons constaté que le lait de coco induisait une transformation irréversible dans les colonies qui avaient subi son action. C'est ainsi que le tissu de Crown-Gall de Tabac qui pousse très régulièrement sur un milieu nutritif classique ne prolifère plus sur ce même milieu, quand on l'y repique après lui avoir fait subir des passages sur un milieu contenant du lait de coco. Il en est de même pour les tissus accoutumés; le lait de coco semble ainsi introduire des besoins nutritifs nouveaux.

d) *Obtention des cultures virosées.*

WHITE (1934) a montré le premier que les virus des plantes pouvaient se multiplier dans des organes de plantes cultivés *in vitro*. Plus

tard, SEGRETAIN (1948) prouva qu'il était possible d'obtenir le développement de colonies à l'apex de fragments de tiges de Tabac virosé et que ces cals ainsi obtenus contenaient du virus; il montra également qu'il était possible d'infecter directement *in vitro* des fragments de tiges de Tabac sain en introduisant au niveau du milieu de culture, une suspension de V.M.T. préalablement tyndallisée. MOREL (1948), ayant obtenu une souche de tissus de Tabac sain accoutumés, put inoculer directement les colonies en les piquant ou en les frottant avec une suspension de virus additionnée d'un abrasif (carborundum); le virus se multipliait dans les cultures et celles-ci contenaient encore le virus après plusieurs repiquages. En même temps que nous obtenions des cultures dépourvues de virus, nous réalisions des cultures de tissus de Crown-Gall et de tissus accoutumés de Tabacs virosés, en prenant des Tabacs préalablement virosés et en les mettant en culture comme il a été dit plus haut. Les colonies obtenues sont repiquées et contiennent du virus. Aucune différence de comportement n'a été observée entre les tissus sains et virosés au cours de leur obtention.

Dans le cas où nous avons utilisé le tissu de Crown-Gall, nous avons inoculé avec *Agrobacterium tumefaciens* des Tabacs préalablement virosés; les tumeurs contiennent alors le virus : ce fait a été vérifié en inoculant à *N. glutinosa* des jus provenant de broyats de tumeurs préalablement centrifugés à basse vitesse.

3° UTILISATION DES SOUCHES DÉCRITES.

Les colonies obtenues sont, au moment de leur emploi, découpées en fragments de 400 mg environ. Les explantats n'ont pas été rigoureusement calibrés, mais nous avons remarqué au cours de nombreuses manipulations qu'il était possible d'obtenir des variations de poids ne dépassant pas $\pm$ 50 mg pour un explantat.

Les explantats provenant d'une même colonie sont disposés, quand il y a lieu, en nombre égal les uns dans le milieu témoin, les autres dans le milieu traité afin d'obtenir au départ des populations de colonies traitées et témoins aussi voisines que possible l'une de l'autre.

Les cultures sont disposées à la lumière diffuse, celle-ci semblant exercer, comme bien des auteurs l'ont remarqué, une action régulatrice sur la croissance.

Les milieux de culture sont ceux décrits au paragraphe précédent mais peuvent, bien entendu, subir des modifications en fonction des nécessités expérimentales.

Au moment de leur utilisation, les colonies sont pesées et nous avons toujours indiqué leur poids au moment du prélèvement sans nous préoccuper de celui de l'explantat, HELLER (1953) ayant montré que l'accroissement relatif (rapport du poids absolu au poids initial) n'était pas un critère correct de croissance.

Les nombres indiqués dans les tableaux sont toujours la moyenne de 6 à 10 mesures.

Quand il a fallu évaluer les constituants biochimiques et le V.M.T., on a réuni, pour réaliser une mesure, 2 à 6 colonies de manière à obtenir un poids frais minimum d'au moins 4 grammes. Les moyennes exprimées proviennent donc de l'estimation d'au moins 12 colonies. Après leur prélèvement et leur pesée, les cultures sont déposées pendant vingt-quatre heures au conservateur à — 15 °C en vue des divers titrages à effectuer.

Enfin, lors de la réalisation d'une expérience, nous avons toujours calculé sur 10 à 12 colonies du lot utilisé la teneur en virus, N.P., N.S., A.R.N. et A.D.N. au départ.

II. La technique des disques de feuilles de tabac

L'emploi de feuilles détachées pour l'étude de certains phénomènes physiologiques est connu depuis longtemps. Vickery et *al.* (1937) mirent au point une technique d'utilisation des disques prélevés sur des feuilles de Tabac, afin d'étudier le métabolisme des divers constituants présents dans ces feuilles. Plus tard, Takahaski (1947) utilisa cette technique afin de suivre, à l'obscurité, les étapes de la multiplication du V.M.T. Depuis, de nombreux auteurs (Commoner et *al.*, 1950-1953; Schlegel et Rawlins, 1954, etc.) l'ont employée pour résoudre certains problèmes relatifs à la multiplication des virus des végétaux.

A. Technique

Les Tabacs utilisés au cours d'une même série d'expériences sont généralement âgés de trois mois et ont été semés et repiqués en même temps. Ils appartiennent à la variété P 19 de Bergerac.

Au moment de l'emploi on choisit ceux qui ont en moyenne 50 cm de haut; on enlève les feuilles trop petites ou lésées ainsi que le bourgeon terminal. On conserve par plante 4 à 5 feuilles ayant de 12 à 15 cm de large et dont la longueur est comprise entre 25 et 35 cm.

Les moyens matériels dont nous disposions ne nous ont pas permis d'utiliser exclusivement des feuilles de même âge et de même position provenant de plantes différentes d'un lot homogène de Tabacs; mais cet inconvénient a été compensé par la technique d'utilisation des disques.

Dans le cas où les expériences réalisées n'impliquent pas d'infection virale, les disques peuvent être prélevés immédiatement et mis en survie dans le milieu convenable.

Si l'expérience porte sur la multiplication du virus, il convient d'inoculer les feuilles *in situ* vingt-quatre heures avant leur prélève-

ment afin d'éviter les éventuelles inhibitions d'infection provoquées par les substances présentes dans les milieux de survie utilisés. Dans ce cas, l'inoculation est effectuée avec une suspension de V.M.T. purifié contenant 10^{-3} g ml de virus. Nous n'employons pas d'abrasif, mais l'infection est faite de façon à éviter les erreurs dues à des différences d'inoculation. Les feuilles sont lavées après leur inoculation, au moment de la mise en survie, elles sont détachées, disposées sur un liège et les disques sont découpés avec un emporte-pièce de 4.5 cm de diamètre, de telle manière que les disques prélevés sur la partie gauche de la feuille soient exactement en face de ceux prélevés sur la partie droite. 3 à 4 disques sont pris sur chaque moitié de feuille, ils sont immédiatement disposés, à raison de 6 par boîte, dans des boîtes de Pétri contenant 100 ml de liquide de survie. Ils peuvent être mis à la lumière ou à l'obscurité. Dans le premier cas ils sont disposés sous des tubes fluorescents d'une puissance de 40 watts chaque à une distance de 80 cm.

Deux problèmes fondamentaux se posent alors :

— Au bout de combien de temps la survie des disques cesse-t-elle d'être complète dans des milieux dépourvus d'éléments carbonés?

— Est-il possible d'obtenir des cultures de disques stériles, ce qui permettrait d'inclure des sucres dans les milieux de culture?

1° *Évaluation du degré de survie des disques.* — Dans l'eau bidistillée, ou dans des milieux ne contenant pas de substances carbonées, la survie des disques est bonne jusqu'à dix jours mais rarement au-delà. En milieu nutritif carboné les infections sont nombreuses dès le troisième jour et l'intégrité des disques est rapidement compromise. Les disques morts ou lésés se reconnaissent facilement à leur aspect translucide et à leur manque de rigidité : ils sont éliminés. En fonction de ce fait, le nombre des disques mis en survie au début d'une expérience est toujours systématiquement plus élevé que celui initialement prévu. Bien entendu quand un disque est lésé on élimine avec lui le traité ou le témoin qui lui correspond. D'autre part, le tirage des éléments biochimiques et particulièrement celui des acides désoxyribonucléiques (cf. 2e partie, chapitre I) permet aussi d'avoir une idée de l'intégrité des disques prélevés.

2° *Problèmes de l'obtention de disques de feuilles stériles.* — De nombreux auteurs américains, Vickery et *al.* (1937), Commoner et *al.* (1950) ont pu obtenir sans difficultés des disques dépourvus de micro-organismes en cultivant stérilement les plantes qu'ils désiraient utiliser. Nos conditions de travail ne nous permettant pas d'obtenir de telles plantes, nous avons dû chercher à avoir des disques stériles par un autre procédé : nous avons adapté la technique de stérilisation utilisée pour les cultures de tissus. Les disques sont prélevés et trempés pendant un quart d'heure dans une solution d'hypochlorite de

Ca à 90 g/l, puis ils sont lavés trois fois pendant vingt minutes dans de l'eau stérile; ils sont ensuite disposés dans des boîtes de Pétri stériles, pourvues du milieu nutritif utilisé, préalablement autoclavé pendant quarante minutes à 110 °C.

Nous avons vérifié que le passage des disques pendant un quart d'heure dans l'hypochlorite était suffisant pour obtenir une survie de huit jours, sans infection notable, dans un milieu glucosé. Au-delà de huit jours la plupart des milieux s'infectent, mais pour des raisons qui seront exposées plus loin, ce temps est suffisant pour les buts que nous nous sommes proposés. D'autre part, si on laisse les disques séjourner plus d'un quart d'heure dans l'hypochlorite, on remarque alors que les disques inoculés, donc lésés, peuvent présenter une teneur en V.M.T. moindre que ceux laissés un quart d'heure seulement, l'hypochlorite détruisant sans doute les cellules lésées au cours de l'infection et le virus qu'elles contiennent.

Nous avons vérifié que le séjour des feuilles pendant un quart d'heure dans l'hypochlorite n'a pas d'influence sur la teneur en virus des disques de feuilles. Ceci tend, par conséquent, à montrer que le développement des bactéries ou des champignons ne gène pas la multiplication du V.M.T. (1). Mais, d'autre part, lorsque les bactéries se développent en abondance le pH du milieu est susceptible de changer et les conditions de survie risquent de se trouver assez profondément modifiées. Le nombre des disques inutilisables après sept jours de survie dans un milieu non stérile est très élevé et, dans nos vérifications, nous n'avons, comme d'habitude, utilisé que les disques dont l'état de conservation était convenable.

B. Les milieux de culture

Ils varient en fonction du problème étudié, mais lorsqu'ils comprennent un sucre, ils ont été autoclavés afin de recevoir des disques eux-mêmes stérilisés comme il a été dit, ou bien nous avons ajouté, pour éviter les infections, de la sulfadiazine à la concentration de 0,300 g/l et de la nystatine à la concentration de 0,080 g/l. Dans ces conditions, ces substances n'ont pas d'action sur la multiplication du V.M.T., comme nous l'avons vérifié. Le pH des milieux est généralement compris d'emblée entre 4,8 et 5,3, ce qui évite la plupart du temps de l'ajuster et d'introduire des ions supplémentaires. Lorsque le pH du milieu dépasse ces limites, il est ajusté à 5,0. Suivant les cas les milieux sont ou non renouvelés chaque jour. Il est à noter que dans les expériences où nous n'avons pas renouvelé le milieu, nous avons constaté en fin de culture des écarts importants par rapport

(1) Ce fait n'est pas surprenant en soi : les infections dans les boîtes de Pétri ne deviennent intenses que vers le cinquième ou sixième jour, c'est-à-dire à un moment où, comme nous le verrons, la multiplication du V.M.T. est déjà assez avancée.

au pH initial, même dans des survies effectuées dans de l'eau distillée : ceci implique des mouvements importants de substances des disques vers le milieu.

C. Prélèvement des disques

Au moment convenable, les disques sont prélevés, lavés dans l'eau distillée, puis soigneusement séchés entre deux feuilles de papier filtre; leur diamètre est mesuré s'il est nécessaire, puis ils sont réunis par deux et pesés (1). Ils sont ensuite enveloppés dans du papier filtre et déposés vingt-quatre heures au conservateur à — 15 °C comme il a été dit pour les cultures.

Chapitre IV

TECHNIQUES DIVERSES

Nous avons utilisé par ailleurs un certain nombre de techniques nous permettant de titrer le phosphore, l'azote protéique, les acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques. Les techniques classiques ont été employées, en les adaptant parfois aux exigences expérimentales.

A. Dosage du phosphore

Après en avoir essayé plusieurs (Fiske et Subbarow, 1925; Berenblum et Chain, 1938), nous avons adopté la technique de Horecker Ma et Haas (1940). La courbe ci-après (fig. 3) est celle que nous avons obtenue et utilisée.

B. Dosage des A.R.N. et des A.D.N.

Nous avons utilisé la méthode de Ogur et Rosen (1952) basée sur l'extraction des A.R.N. et des A.D.N. par des concentrations différentielles d'acide perchlorique.

(1) Ceci afin de faire porter nos mesures sur des quantités valables de virus et de constituants biochimiques.

Les prélèvements des traités et des témoins peuvent être faits en une fois à la fin d'un laps de temps déterminé ou, au contraire, s'échelonner régulièrement sur une période plus ou moins longue si l'on veut suivre l'évolution d'un ou plusieurs facteurs. Dans ce dernier cas, il est évident que les lots prélevés ne se correspondront plus rigoureusement.

Les résultats sont souvent exprimés en teneur pour un disque. Dans nos conditions de prélèvements et de survie la substance sèche des disques est, comme nous le verrons, pratiquement constante : le disque constitue ainsi une entité valable de référence.

La teneur en A.R.N. et A.D.N. des extraits obtenus est évaluée par spectrophotométrie à 2 650 Å pour les A.R.N. et à 2 580 Å pour les A.D.N. Les spectres d'absorption des solutions obtenues sont exactement ceux d'A.R.N. et d'A.D.N. purifiés.

L'évaluation pondérale des A.R.N. et des A.D.N. est faite à l'aide d'une courbe étalon établie pour chacun de ces acides à l'aide d'acide ribonucléique de levure hautement purifié et d'acide désoxyribonucléique extrait de thymus de veau.

L'examen des deux courbes (fig. 4 et 5) montre que 1 µg d'A.R.N. correspond à 29 divisions du spectrophotomètre, tandis que 1 µg d'A.D.N. correspond à 25 divisions. Ces valeurs moyennes ont été trouvées au cours d'un grand nombre de mesures effectuées tout au long de notre travail.

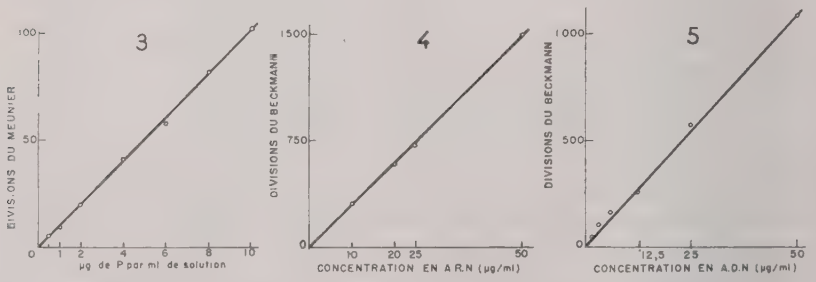


Fig. 3 : Évaluation de la teneur en P d'une solution par spectrophotométrie.
Fig. 4 : Courbe de titrage des A.R.N. par spectrophotométrie.
Fig. 5 : Courbe de titrage des A.D.N. par spectrophotométrie.

C. Titrage de l'azote protéique (N.P.) et de l'azote soluble (N.S.)

Nous avons considéré avec de nombreux auteurs (par exemple Commoner, 1953, etc.) que l'azote protéique correspondait à celui qui précipitait dans l'alcool à 70 %. Nous avons d'ailleurs vérifié que les résultats obtenus par la méthode de précipitation à l'alcool se recoupaient avec ceux obtenus avec l'acide trichloracétique. La précipitation alcoolique étant plus rapide, nous l'avons utilisée.

L'azote protéique est dosé dans le culot de centrifugation et l'azote soluble dans le surnageant par la méthode de Kjeldahl.

D. Analyse des résultats

Dans un travail comme celui que nous présentons et qui porte essentiellement sur la comparaison entre un matériel traité et un matériel témoin, il est important de savoir si les différences constatées sont dues au hasard ou au contraire à l'intervention du facteur étudié.

Nous avons à cette fin appliqué les formules du calcul statistique classique : Fischer (1952).

Nous avons calculé pour chaque expérience l'erreur standard de la moyenne en appliquant la formule :

$$\sigma m = \sqrt{\frac{\Sigma (x - m)^2}{n (n - 1)}}$$

où x représente une valeur déterminée et m la valeur de la moyenne, n le nombre de mesures effectuées (on emploie $n - 1$ si n est inférieur à 30). Nous avons calculé l'écart de la différence des moyennes σ dm par la formule :

$$\sigma dm = \sqrt{\Sigma (x - m)^2 + \Sigma (x' - m')^2} \quad \sqrt{\left(\frac{1}{n} + \frac{1}{n'}\right) \frac{1}{n + n' - 2}}$$

x et m ont la même signification que précédemment et n et n′ représentent le nombre de mesures effectuées dans chaque série (témoin et traité).

On détermine ensuite la valeur du paramètre t par la formule :

$$\frac{m - m'}{\sigma dm}$$

où m' et m représentent la valeur des moyennes obtenues. On compare ensuite t aux valeurs indiquées dans la table de Student-Fischer.

Dans le cas des disques de feuilles on a pu montrer que des séries prélevées sur les moitiés correspondantes des feuilles avaient des teneurs en A.R.N., A.D.N., N.P., et éventuellement virus, qui différaient de moins de 3,5 % en moyenne, ceci explique que souvent, dans nos expériences sur les disques, des différences qui apparaissent comme relativement faibles entre traités et témoins sont cependant significatives.

Chapitre V

RECHERCHES SUR LES TECHNIQUES DE PURIFICATION ET DE TITRAGE DU V.M.T.

I. Recherches sur la purification du V.M.T. : Étude critique comparative de quelques techniques

La technique spectrophotométrique que nous nous proposons d'employer implique la purification préalable du virus contenu dans le matériel virosé. Nous avons cherché quelle méthode de purification convenait le mieux et nous avons profité de cette recherche pour étudier l'incidence des techniques de purification sur le comportement quantitatif et qualitatif des suspensions virosées.

A. Purification du V.M.T. des feuilles

1° Méthode expérimentale.

Des Tabacs âgés de deux mois (*Nicotiana tabacum*), et cultivés dans la serre de l'institut Pasteur, sont inoculés avec une suspension concentrée de V.M.T.; au bout de huit semaines, les feuilles sont récoltées et disposées vingt-quatre heures au congélateur. Ce traitement permet à la fois d'obtenir davantage de jus et aussi de fragmenter les protéines normales qui sont ainsi éliminées plus facilement. Les feuilles sont ensuite broyées au hachoir, puis disposées dans une gaze et comprimées de façon à en extraire le jus; celui-ci est alors centrifugé à basse vitesse, puis on en prélève un litre qu'on répartit en 4 lots égaux (250 ml); ces 4 lots sont dénommés : A, B, C, D.

a) *Purification de la fraction* A.

La fraction A est purifiée chimiquement. Elle est additionnée d'un volume de $PO_4H\ Na_2$, on laisse reposer une demi-heure, on centrifuge à 6 000 g, le surnageant est recueilli et additionné de $SO_4(NH_4)^2$ saturé de manière à obtenir une solution de $SO_4(NH_4)^2$ au tiers de saturation : le virus précipite et on centrifuge à 6 000 g pendant une demi-heure. L'opération est répétée trois fois. On procède enfin à une précipitation à pH 3,3 à l'aide d'HCl N/10. On centrifuge, on remet en suspension dans 30 ml d'eau bidistillée, on met à dialyser vingt-quatre heures dans un dialyseur en collodion, contre de l'eau bidistillée; le volume final est ramené à 50 ml. Nous avons obtenu une suspension opalescente dépourvue de toute coloration brune (coloration due, quand elle se produit, à une combinaison du V.M.T. avec des nucléoprotéines normales de l'hôte : Ginoza et *al.* (1954).

b) *Purification de la fraction* B.

La fraction B a été purifiée en utilisant deux cycles de centrifugations alternés à haute et à basse vitesse. Après la centrifugation effectuée sur le jus initial pour éliminer les débris végétaux, on ultra-centrifuge le jus à 100 000 g pendant cent minutes, à l'aide d'une ultra-centrifugeuse Spinco modèle L. Les culots sont remis en suspension dans de l'eau bidistillée et laissés pendant douze heures à la température du laboratoire, puis les suspensions sont centrifugées dix minutes à basse vitesse. De nouveau une ultra-centrifugation et une centrifugation sont effectuées, dans des conditions identiques à celles qui viennent d'être décrites. Bien entendu, au cours de toutes ces manipulations, toutes les précautions sont prises pour que les pertes en matériel viral soient aussi faibles que possible. Le volume final de la suspension est ramené à 50 ml. La suspension ainsi obtenue est opalescente, mais présente une coloration brune assez forte. D'ailleurs au cours des ultra-centrifugations, le culot obtenu a toujours été fortement coloré et les centrifugations à basse vitesse ont permis d'éliminer chaque fois une proportion assez considérable d'impuretés.

c) *Purification de la fraction* C.

Elle a été conduite d'une manière analogue à celle de la fraction B, à cette différence près qu'on a chauffé le jus virosé pendant un quart d'heure à 60 °C, ceci avant toute centrifugation et dans le but de faire coaguler les protéines normales, le V.M.T. n'étant pas affecté par la chaleur dans ces conditions. La suspension finale elle aussi est de 50 ml, sa coloration brune est bien moins intense que celle de la suspension B.

d) *Purification de la fraction* D.

Les 250 ml de jus ont été mélangés à un volume de chloroforme, agités longuement, puis centrifugés à basse vitesse pendant une demi-heure, l'émulsion se sépare en deux couches. La phase chloroforme entraîne avec elle la chlorophylle, les pigments caroténoïdes et les lipides, tandis que la phase aqueuse contient le virus. Une ultra-centrifugation est opérée sur la phase aqueuse, le virus est remis en suspension dans l'eau bidistillée, puis centrifugé à basse vitesse. Le volume final est ramené à 50 ml. La suspension ainsi obtenue est opalescente avec une légère coloration brune.

2° Étude des propriétés comparées des suspensions de virus obtenues.

Les suspensions ont été étudiées du point de vue de leur teneur, en virus, de la constitution chimique de celui-ci, de leur aspect au microscope électronique et de leurs propriétés biologiques.

a) *Concentration en virus et constitution chimique.*

Le tableau I met en évidence les points suivants : La *suspension C* est celle qui contient le plus de virus; c'est elle aussi pour laquelle la correspondance entre l'évaluation spectrophotométrique du virus et son évaluation par le titrage de l'N (méthode de Kjeldahl) est la meilleure. Il est donc logique d'admettre que cette technique de préparation est, à notre point de vue, la plus satisfaisante.

La suspension A voit un écart important entre les deux modes d'évaluation (17 %). Ce fait est probablement dû à ce qu'un certain nombre d'ions (NH_4) ont pu rester adsorbés sur les particules de virus, malgré la dialyse et fausser ainsi l'évaluation par la technique de Kjeldahl. D'autre part, on remarque que les précipitations successives par le sulfate d'ammonium impliquent des pertes importantes si nous ne tenons compte que de l'évaluation spectrophotométrique. La *suspension B* montre une meilleure correspondance entre les deux modes d'évaluation du virus que la suspension A; cependant, il y a plus d'azote dans la suspension que l'évaluation spectrophotométrique pouvait le laisser prévoir. Il est logique de penser que cette différence est due à la présence, à côté du virus, de nucléo-protéines normales du Tabac. L'aspect brun de la suspension confirme ce fait (Ginoza et *al.*, 1954). Enfin, les pertes en matériel viral sont plus importantes dans le cas de la préparation B que dans celui de la suspension C. Cela est dû au fait que les impuretés éliminées par la chaleur dans le cas de la préparation C sédimentent avec le virus dans la préparation B et que, la remise en suspension se faisant assez difficilement, des particules de virus doivent être éliminées avec les impuretés.

La *suspension D* montre aussi une assez mauvaise correspondance entre les deux modes d'évaluation, mais ici c'est la spectrophotométrie qui donne une estimation plus forte que celle de l'évaluation par l'azote. Ce fait est sans doute dû à la présence d'impuretés absorbant dans l'U.V.

Tableau I

Concentration et caractéristiques chimiques du V.M.T. des suspensions obtenues par diverses techniques de purification

Dénomination des jus	µg de virus par ml (spectrophotométrie)	µg de virus par ml (Kjeldahl)	µg de P par ml	Rapport P/prot. V. (Kjeldahl) %	Rapport P/prot. V. (spectrophotométrie) %	Différence entre les 2 modes d'évaluation
A	1 530	1 850	8,4	0,450	0,550	17 %
B	1 730	1 810	10,4	0,580	0,600	4 %
C	2 020	2 030	13,4	0,655	0,658	0 %
D	1 970	1 830	12	0,655	0,610	8 %

Fig. 6 : Microscopie électronique des différentes suspensions du V.M.T.

a) Suspension A. *b*) Suspension B.
c) Suspension C. *d*) Suspension D.

Des considérations ci-dessus, on peut déduire que deux ultra-centrifugations alternées avec deux centrifugations à basse vitesse, après chauffage préalable à 60 °C, représentent la meilleure méthode de purification du V.M.T. en vue de son titrage par spectrophotométrie. Ceci confirme, en le précisant, ce qui avait été vu par Schlegel et Rawlins (1953). D'autre part, l'étude du rapport P/protéine appelle les remarques suivantes : si l'on peut considérer qu'il est à peu près équivalent pour les suspensions B et C, quel que soit le mode de titrage du virus, il diffère sensiblement pour les préparations A et D. Dans le cas de la préparation A nous ne pouvons valablement tenir compte que de la valeur 0,550 : cette valeur correspond très précisément à celle qui est communément admise par les auteurs travaillant sur des préparations hautement purifiées de virus (Pirie, 1955). Les rapports relativement plus élevés des autres préparations sont assez difficiles à interpréter. Il est vraisemblable qu'ils sont dus à la présence de composés phosphorés, sans rapport avec le V.M.T., et que l'usage des techniques purement physiques n'auraient pu éliminer; on voit mal, cependant, comment ces composés auraient pu sédimenter individuellement en même temps que le virus; il faut donc admettre qu'ils forment avec celui-ci un complexe plus ou moins intime. Ces complexes existent comme nous l'avons déjà dit et ils ont lieu entre le virus et les protéines, et surtout les nucléoprotéines normales, de l'hôte. Ces dernières quoique mal connues (Holden et Pirie, 1955), semblent plus riches que le virus en phosphore. Ces complexes peuvent être dissociés avec le phosphate ou le citrate de Na; dans quelques essais que nous avons effectués avec du citrate de Na à 0,1 M nous avons obtenu une élimination des éléments complexés avec le virus, éléments qui se sont révélés contenir des proportions de P relativement importantes.

b) *Étude des images électroniques des préparations obtenues.*

Nous avons étudié l'aspect, au microscope électronique, des suspensions de virus que nous avons obtenues. Les photographies jointes (fig. 6) ont été obtenues avec un microscope électronique Siemens, type E (microscope du service du professeur Lépine). Elles sont dues à l'obligeance de Mlle Odile Croissant. La technique employée a été la technique classique, mais l'ombrage a été obtenu grâce à des pulvérisations de carbone. On voit immédiatement que l'aspect des suspensions n'est pas le même. La suspension A est surtout riche en unités élémentaires non agrégées d'environ 300 mμ (monomères); les dimères (2 monomères agrégés) et les trimères (3 monomères) sont relativement rares.

Les suspensions B et C montrent une tendance très nette à l'agrégation des particules bout à bout; ceci est en conformité avec l'opinion de nombreux auteurs, sur l'influence de l'ultra-centrifugation sur

l'agrégation des particules de virus. On remarque que le traitement, préalablement opéré par la chaleur, aboutit non seulement à l'agrégation longitudinale mais aussi à l'agrégation latérale, cependant l'aspect de la suspension C se rapproche assez de celui de la suspension A.

Quant à la suspension D elle présente un degré élevé d'agrégation longitudinale; nous avons pu mettre ainsi en évidence un fait qui, à notre connaissance, n'a jamais été signalé : le haut pouvoir agrégeant du chloroforme.

c) *Les propriétés biologiques.*

Les propriétés biologiques des suspensions ont été étudiées à l'aide de la méthode des lésions locales sur *N. glutinosa*. Nous n'avons pu obtenir de différences significatives entre les diverses suspensions, ce qui est logique, car les différences de concentrations en virus purifié n'étaient pas suffisantes pour être mises en évidence par ce mode de titrage. Cependant, la suspension D, bien qu'ayant une teneur en V.M.T. élevée, a donné moins de lésions que les autres suspensions : l'état d'agrégation des particules diminue la virulence; ce fait est en accord avec ce qui sera exposé dans la troisième partie du présent mémoire, au sujet de la virulence du V.M.T.

En CONCLUSION : Les résultats obtenus montrent que les techniques de purification influent non seulement en induisant des pertes plus ou moins considérables en virus, dans les suspensions étudiées, mais encore en modifiant la constitution chimique, l'aspect morphologique et les propriétés biologiques du V.M.T. Nous avons mis en évidence :

1° Que la purification chimique permettait d'obtenir un virus très pur, peu agrégé et de virulence élevée, mais le nombre des manipulations, et l'importance des pertes qu'elle suscite, font que nous n'avons pas employé cette méthode pour les titrages; par contre, lorsque nous avons voulu, à l'occasion de recherches sur les rapports entre la structure et la virulence du V.M.T. (cf. 3e partie), obtenir des suspensions de V.M.T. hautement purifiées, c'est cette technique que nous avons adoptée.

2° Les techniques physiques, du moins avec notre souche, favorisent la formation de complexes entre le V.M.T. et les nucléoprotéines normales de l'hôte. Nous avons en particulier mis en évidence un enrichissement relatif en P des suspensions de virus et nous avons confirmé la possibilité de dissocier ces complexes colorés en utilisant le citrate de soude (GINOZA et *al.*, 1954).

3° Nous avons montré l'importance des phénomènes d'agrégation au cours des purifications, et nous avons découvert que le chloroforme provoquait l'agrégation rapide des particules de V.M.T. L'agrégation

étant, pour nous (cf. 3e partie), un phénomène impliquant des modifications à l'intérieur même de la particule élémentaire virulente, on comprend que l'emploi de certaines techniques de purification peut affecter les propriétés biologiques du V.M.T. et, par conséquent, modifier l'évaluation quantitative des suspensions.

4° La technique qui nous a permis d'obtenir la suspension C est celle qui convient le mieux pour les titrages que nous nous proposons d'effectuer. En effet, il est vraisemblable que le virus isolé n'est pas rigoureusement pur et comporte des nucléoprotéines normales de l'hôte, mais cet inconvénient est bien plus faible que ceux présentés par les autres techniques étudiées. C'est pourquoi c'est elle qui a été systématiquement utilisée au cours de nos titrages.

B. Purification du V.M.T. des cultures

Nous n'avons pu reprendre, à propos du virus des cultures, le travail effectué pour celui des feuilles : les cultures de tissus contenant très peu de virus, il est impossible d'obtenir une quantité de V.M.T.

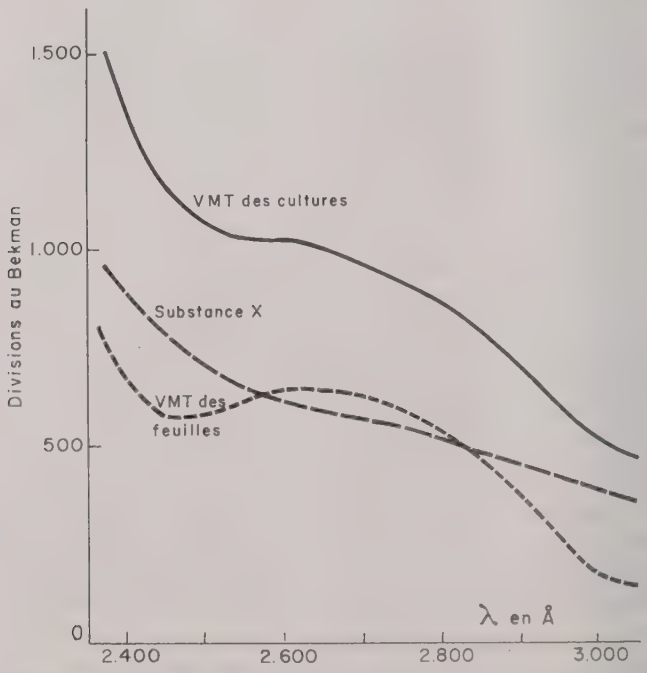


Fig. 7 : Spectres d'absorption comparés du V.M.T. des feuilles, du V.M.T. des cultures et de la substance X des cultures.

suffisante. Nous avons donc appliqué au virus des cultures la technique de purification adoptée pour la suspension C, mais nous avons recherché si la méthode de titrage spectrophotométrique pouvait s'appliquer aussi bien au virus des cultures qu'à celui des feuilles. En effet, de nombreux auteurs (Takahashi, 1951; Commoner et *al.*, 1950; Schlegel et Rawlins, 1953) et nous-même avons vérifié que des feuilles non virosées, traitées comme si elles l'étaient (méthode C) ne donnaient aucun culot de centrifugation et que les suspensions obtenues ne présentaient qu'une absorption négligeable dans l'U.V. (au maximum une absorption correspondant à 8 µg de V.M.T.).

Au cours d'une expérience, nous avons traité par la méthode de purification décrite (méthode C) des colonies de tissus accoutumés de Tabac non virosés poussant sur le milieu de base classique et nous avons découvert l'existence d'une substance ultra-centrifugeable qui, remise en présence de 5 ml d'eau bidistillée, donnait une suspension opalescente dont l'absorption dans l'U.V. à 2 650 Å n'était pas négligeable. Ce résultat a été retrouvé régulièrement au cours des expériences relatées dans ce mémoire et pour lesquelles nous avons toujours constitué des témoins non virosés; d'autre part, cette substance a été mise en évidence chez toutes les souches de tissus de Tabac employées.

La figure 7 montre que le spectre d'absorption du V.M.T. des cultures est différent de celui des feuilles; le ressaut à 2 650 Å n'est pas marqué : ceci est sans doute dû à la présence de la substance X qui interfère; toutefois, cette substance X et la suspension contenant le V.M.T. des cultures ont des spectres très différents. La nature de cette substance ne nous est pas connue bien que des recherches préliminaires aient montré qu'elle ne contenait pas de phosphore, mais de faibles quantités d'N. Il est possible qu'il s'agisse d'une mucoprotéine ou d'un polysaccharide (l'N étant alors un contaminant). Nous ne pensons pas que cette substance puisse être assimilée à celle mis en évidence par Camus et *al.* (1954) dans les tissus de Crown-Gall de Scorsonère. Au cours d'une cinquantaine de mesures nous avons évalué, en son équivalent pondéral de V.M.T., la teneur des tissus accoutumés de Tabac en substance X et nous avons trouvé 64 µg par gramme de poids frais et 100 µg par milligramme de N.P.

Les variations de la teneur des colonies en cette substance sont faibles au cours de la croissance, bien qu'il semble avoir tendance à augmenter à la fin de celle-ci. Les valeurs signalées plus haut ont été systématiquement retirées des chiffres obtenus lors de l'évaluation spectrophotométrique de la quantité de virus dans les tissus virosés.

L'existence de la substance X pose évidemment le problème de la validité de l'évaluation spectrophotométrique de la teneur des cultures de tissus en V.M.T. Cette question sera abordée un peu plus loin.

II. Recherche sur le degré de correspondance entre les divers modes de titrage du V.M.T.

Le but de ces recherches n'a pas été d'étudier le degré de précision de chacune des trois principales méthodes de titrage du V.M.T., ce point ayant été longuement envisagé avant nous. Il fallait s'assurer que les résultats obtenus dans nos conditions expérimentales, par une méthode de titrage, pouvaient être vérifiés par une autre méthode et qu'une bonne correspondance existait entre les divers modes de titrage.

1° *Correspondance entre le titrage spectrophotométrique du V.M.T. et le titrage au moyen des lésions locales.*

Des disques provenant de feuilles préalablement inoculées, comme il a été dit, sont mis en survie dans du Knop au demi durant sept jours à la lumière. Le virus est extrait par des centrifugations alternées à haute et basse vitesse avec chauffage préalable (technique C, chapitre IV). Les culots de la dernière ultra-centrifugation sont repris dans 5 ml d'H^2O bidistillée.

La teneur en V.M.T. des suspensions finales a été évaluée par spectrophotométrie, puis avec ces mêmes suspensions on a inoculé des *N. glutinosa* dans les conditions décrites au chapitre III.

Le tableau II résume les résultats obtenus.

Tableau II

Correspondance entre l'évaluation du V.M.T. par spectrophotométrie et par la technique des lésions locales

	Teneur en virus en µg pour 1 disque				Nombre de lésions correspondant pour 12 demi-feuilles		
N°	Côté gauche	N°	Côté droit	$\beta = \frac{V.g}{V.d}$	Côté gauche	Côté droit	$\beta = \frac{V.g}{V.d}$
1	680	1′	765	0,89	214	292	0,73
2	790	2′	1 000	0,79	292	448	0,65
3	840	3′	835	1,01	362	344	1,05
4	735	4′	635	1,16	240	266	0,91
5	730	5′	920	0,79	736	726	1,01
6	760	6′	725	1,05	658	566	1,15
7	625	7′	770	0,81	520	518	1,01
8	875	8′	950	0,92	236	228	1,03
9	565	9′	575	0,98	236	202	1,16
10	640	10′	675	0,95	228	348	0,66
11	700	11′	790	0,89	408	396	1,03
12	755	12′	660	1,14	416	222	1,87
	8 695		8 300	M = 0,95	4 546	4 556	M = 1,02

Le rapport du nombre des lésions du côté gauche des feuilles et du côté droit inoculés avec le même jus a été en moyenne de 1,14. On en déduit que la dispersion moyenne est égale à $\pm$ 0,14.

On voit tout d'abord que les différences les plus considérables trouvées au moyen de la spectrophotométrie entre deux lots comparables ont été de l'ordre de 27 %; de plus, trois rapports de lésions attirent l'attention : 0,65, 0,66, 1,87, mais le calcul statistique clas-

sique effectué sur les 12 demi-feuilles inoculées montre qu'aucune des valeurs trouvées pour ces disques n'est significative, la différence dans le nombre total des lésions dépendant dans les trois cas de 1 ou 2 valeurs particulièrement dispersées et qu'on aurait été en droit d'éliminer. On remarque également que pour certaines différences élevées de la spectrophotométrie, le rapport du nombre des lésions est satisfaisant. D'autre part, si l'on fait le total des teneurs pondérales en virus et du nombre des lésions locales pour chaque série, on voit que les résultats sont concordants et que dans son ensemble la technique des lésions locales apporte une confirmation solide aux résultats obtenus par spectrophotométrie.

Il faut aussi remarquer que, contrairement à ce que pensent certains auteurs, la différence en pourcentage trouvée entre le nombre des lésions produites par deux jus virosés comparés ne représente absolument pas la différence réelle de concentration des deux jus en particules virales.

En conclusion, cette étude montre que les comparaisons menées au moyen de la spectrophotométrie sont confirmées par la technique des lésions locales, cette dernière ne permettant pas, dans nos conditions, de mettre en évidence avec certitude des différences inférieures à 30 %.

2° *Correspondance entre le titrage spectrophotométrique et le titrage sérologique du V.M.T.*

Une expérience identique à celle du paragraphe précédent a été réalisée et la teneur en V.M.T. des suspensions évaluée au moyen de la spectrophotométrie et de la sérologie. Nous avons volontairement pris des disques ayant été disposés dans des conditions de survie différentes les unes des autres (à l'obscurité) de façon à avoir des variations sensibles de la concentration en virus. Nous n'avons pas indiqué les résultats pour les lots de disques se correspondant : ils ont été identiques.

Le tableau III résume les résultats obtenus.

TABLEAU III

Correspondance entre le titrage du V.M.T. par la spectrophotométrie et par la méthode sérologique

N° des disques	TITRAGE AU SPECTROPHOTOMÈTRE Teneur en V.M.T. en µg pour 1 disque	TITRAGE SÉROLOGIQUE (lecture après vingt-quatre heures) Dilution des suspensions						
		1/5	1/10	1/20	1/30	1/40	1/50	1/60
1	308	+++	++	·		—		—
2	475	+++	++	+	—	—	—	—
3	490	+++	++	+	±	—		—
4	750	++++	+++	++	+	+	+	—
5	965	++++	+++	++	+	+	+	—
6	990	++++	+++	++	+	+	+	—
7	935	++++	+++	++	+	+	+	—
8	935	++++	+++	++	+	+	+	—

On voit immédiatement que la correspondance entre les deux modes de titrage est bonne : le disque 1 a deux et demie à trois fois moins de virus que le disque 8 aussi bien par l'une ou l'autre méthode. Cependant, la même différence semble exister entre le disque 1 et le disque 4 : la sérologie ne permet pas de voir des différences de moins de 30 % : les dilutions intermédiaires entre 1/50 et 1/60 ne donnant pas de résultats facilement interprétables.

Cas des cultures de tissus.

La substance X, mise en évidence dans les cultures de tissus non virosées et dont nous avons toutes raisons de penser qu'elle existe aussi dans les cultures virosées, gêne le titrage spectrophotométrique. Nous avons entrepris de vérifier la validité de la technique spectrophotométrique dans l'évaluation de la teneur en V.M.T. des cultures de tissus. A cette fin, l'expérience suivante a été réalisée : 4 colonies de tissus accoutumés virosés, âgées de trente-cinq jours, pesant en tout 12,5 g, ont été broyées en présence d'eau, et traitées de la façon habituelle pour en extraire le V.M.T., les mêmes opérations ont été réalisées sur 12,5 g de feuilles de Tabac infectées depuis trois mois. La teneur en V.M.T. des jus finalement obtenus a été évaluée par spectrophotométrie et a donné les résultats suivants :

Virus des feuilles : 63,5 mg
Virus des cultures : 1,620 mg

ce qui montre que, dans le cas présent, les tissus accoutumés de Tabac ont trente-huit fois moins de virus que les feuilles.

Sur les jus isolés nous avons entrepris un titrage sérologique afin de vérifier les résultats obtenus par spectrophotométrie.

Tableau IV

Comparaison de la teneur en V.M.T. de feuilles de Tabac et de cultures de tissus par la technique sérologique

DILUTION des jus initiaux (1)	SUSPENSION DES FEUILLES Temps de lecture					SUSPENSION DES CULTURES Temps de lecture				
	1 h	2 h	3 h	16 h	24 h	1 h	2 h	3 h	16 h	24 h
1										
1/2	++++	++++	++++	++++	++++	++	++	++	+++	+++
1/4	++++	++++	++++	++++	++++	++	++	++	+++	+++
1/8	++	+++	+++	++++	++++	−	++	++	++	++
1/16	+	++	++	+++	+++	−	−	−	+	++
1/32	−	+	+	++	++	−	−	−	−	+
1/64			+	++	++	−	−	−	−	−
1/128										
1/256	−	−								
1/512										

La lecture du tableau IV indique que la suspension virale provenant des cultures est huit fois moins concentrée que celle des feuilles, comme celle-ci a été diluée cinq fois, on constate que les suspensions extraites des feuilles sont quarante fois plus concentrées que celles des cultures. Comme d'autre part la dilution de 1/32 est vraiment à l'extrême limite pour la précipitation du V.M.T. des cultures, les dilutions intermédiaires entre 1/32 et 1/64 se sont révélées inutiles. L'accord entre les deux modes d'évaluation est donc très satisfaisant. La méthode spectrophotométrique reste valable dans le cas des cultures de tissus et, ainsi que nous l'avons vu, plus facile à manier. Par ailleurs la substance X ne provoque aucune précipitation avec l'antiserum (ceci est logique : les antiserums ayant été préparés avec du V.M.T. extrait de feuilles de Tabacs); elle ne provoque pas de lésions sur *N. glutinosa*. Cette substance X est peut-être, comme nous le verrons plus loin, responsable à la fois de la diminution de la virulence du V.M.T. des cultures de tissus et de l'aspect particulier de celui-ci au microscope électronique. Il est à noter à ce sujet qu'aucun auteur ayant travaillé cette question ne semble avoir signalé ce fait, et qu'en conséquence les teneurs en V.M.T. qu'ils indiquent sont sujettes à caution.

3° *Correspondance entre le titrage spectrophotométrique et le titrage chimique du V.M.T.*

Au cours d'une expérience réalisée dans des conditions analogues à celles de la précédente, nous avons extrait le V.M.T. et les suspensions finales ont été titrées à la fois par spectrophotométrie et par évaluation de la teneur en azote.

En résumé, au cours de ce chapitre nous avons mis en évidence :

Que les techniques de purification exerçaient une influence sur les propriétés du V.M.T.;

- Qu'il était indispensable avant d'effectuer des évaluations quantitatives de connaître les propriétés essentielles du matériel hôte à l'intérieur duquel se multiplie le virus, et d'adapter les méthodes de titrage choisies au matériel utilisé;
- Que les cultures de tissus de Tabac sain contenaient une substance ultra-centrifugeable dont la présence en même temps que celle du V.M.T. pose d'intéressantes et délicates questions;
- Que, dans les conditions où nous travaillons, les diverses méthodes de titrage ne sont jamais en désaccord et que la spectrophotométrie est la plus intéressante pour les évaluations quantitatives précises.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES SUR LA MULTIPLICATION DU V.M.T. DANS DIVERS TYPES DE TISSUS DE TABAC

Chapitre premier

PHYSIOLOGIE DU MATÉRIEL EXPÉRIMENTAL

A. Introduction

Un grand nombre d'auteurs a montré que la multiplication des virus des végétaux et plus particulièrement du V.M.T. était influencée par l'état physiologique de l'hôte, même quand celui-ci était modifié avant l'inoculation du virus. Ainsi, si l'on dispose des plantes vingt-quatre heures ou plus à l'obscurité avant leur inoculation, le virus se multiplie davantage que si les plantes ont été laissées à la lumière (Bawden et Roberts, 1947-1948). De même, Tinsley (1953) a montré que si l'on augmente la teneur en eau des plantes, avant leur inoculation, la teneur en virus est plus grande. Hitchborn (1954) ayant par ailleurs montré que les feuilles de *Phascolus vulgaris* carencées en azote étaient plus sensibles au virus de la nécrose du Tabac que les feuilles normales, Humphries et Kassanis (1955) ont tenté de relier l'action de l'obscurité sur la multiplication du V.M.T. à la protéolyse qui se produit dans ce cas. Par ailleurs, de nombreux travaux ont été entrepris sur l'action de la température sur la multiplication des virus (Holmes, 1934; Harrisson, 1956; Kassanis, 1957; Lebeurier, 1958), celle-ci favorisant ou inhibant, suivant les conditions, la multiplication des virus et modifiant même les caractères de la souche employée.

De même, les feuilles irradiées avec des doses convenables d'U.V. avant leur inoculation produisent moins de virus que les feuilles témoins, elles peuvent récupérer leur pouvoir de procéder à la synthèse du virus si elles sont exposées quelques heures avant leur inoculation à la lumière (Bawden et Kleczkowski, 1953).

Ces faits nous ont conduit à penser que l'étude comparative des mécanismes de multiplication du V.M.T., dans des disques de feuilles où les cellules ne se divisent pas ou peu, et dans des cultures de tissus de Tabac, où les divisions cellulaires sont nombreuses, pourrait nous permettre de distinguer certains aspects particuliers de la multiplication des virus. Mais il est alors évident que la connaissance de la physiologie comparée du matériel utilisé est essentielle.

B. Comportement physiologique des cultures de tissus et des disques de feuilles en survie

Le comportement des cultures de tissus et des disques de feuilles de Tabac, au cours de la croissance des uns et de la survie des autres, a été étudié. Il a paru utile de préciser les caractères physiologiques du matériel et leurs variations par l'étude de l'évolution de ses constituants biochimiques fondamentaux (N.P., N.S., A.R.N., A.D.N.).

1° Les problèmes de croissance.

La croissance étant généralement définie comme un accroissement irréversible de taille et de poids, c'est sous cet angle qu'elle sera envisagée dans ce paragraphe.

a) *Cas des cultures de tissus.*

Nous avons suivi pendant quatre-vingt-dix jours la croissance des souches de tissus de Tabac dont nous disposions. Les mesures ont porté aussi bien sur des cultures virosées que sur des colonies saines. Aucune différence n'a jamais été constatée. La figure 8 (p. 91) résume les résultats obtenus.

On peut faire les remarques suivantes :

— La croissance des cultures exprimée par le poids frais est surtout active pendant les deux premiers mois, le taux de croissance diminue beaucoup entre le deuxième et le troisième mois, et ceci pour tous les types de colonies. Mais le point d'inflexion des courbes obtenues n'est pas situé au même endroit, et leurs pentes n'est pas non plus la même entre le deuxième et le troisième mois, particulièrement pour les tissus poussant sur 10 % de lait de coco.

— Les tissus accoutumés de Tabac poussent bien, surtout ceux cultivés sur 50 g de glucose; il est vrai qu'ils proviennent d'une souche différente de celle que nous avons isolée sur 35 g de saccharose.

— Les tissus de Crown-Gall ont une croissance pondérale moindre que celle des tissus accoutumés : ce fait est conforme aux observations de Morel (1948).

— Les courbes obtenues permettent de penser qu'après une phase de latence relativement brève (Lance, 1957), la croissance proprement dite se divise en deux phases : une *phase dynamique* au cours de laquelle les divisions sont nombreuses et l'emportent en intensité sur l'accrois-

sement » des cellules. Cette phase a une durée variable suivant les souches considérées et leurs conditions de culture, mais il est logique d'admettre que, au fur et à mesure que le temps s'écoule, l'équilibre se déplace vers les phénomènes d'accroissement, et c'est ainsi que s'installe une seconde phase ou phase « d'accroissement » pendant laquelle les cellules grandissent et accumulent des réserves. Le point d'inflexion des courbes de croissance permet approximativement de situer le début de la seconde phase. La durée de chacune de ces deux phases est variable d'une souche à l'autre, mais dans le cas présent on peut admettre que la première dure sensiblement plus longtemps que la seconde. Suivant les circonstances les deux phases peuvent être décalées l'une par rapport à l'autre; de toute façon, au delà du troisième mois, les colonies se nécrosent et la sénescence proprement dite commence.

— Dans l'ensemble, la croissance des cultures de tissus est régulière, particulièrement celle des tissus accoutumés.

b) *Cas des disques de feuilles.*

Les disques de feuilles mis en survie présentent des phénomènes de croissance qui ont été étudiés par un certain nombre d'auteurs (DE ROPP, 1945-1947; MILLER, 1951-1952-1954, etc.) sur des matériels différents du nôtre. Au cours de plusieurs expériences nous avons entrepris l'étude de la croissance de disques virosés et non virosés : nous n'avons pas trouvé de différence dans le comportement des disques sains ou infectés.

Les mesures sont effectuées sur des disques mis pendant sept jours en survie à la lumière dans du Knop au demi.

La figure 9 résume les résultats obtenus.

On voit que :

– Les phénomènes de croissance chez les disques de feuilles s'expriment par un changement de dimension : le diamètre des disques augmente. On remarque que l'augmentation moyenne est de 4 mm (le diamètre étant, comme il a été dit, de 45 mm au moment de la mise en survie). L'augmentation maxima de diamètre est de 8 mm.

— Les disques dont la croissance est la plus active sont ceux qui présentent les nervures secondaires les plus importantes : il faudra donc tenir compte, dans la mesure du possible, de ce phénomène lorsque l'on prélèvera les disques sur les moitiés correspondantes des feuilles.

Le tableau V montre les variations du poids frais et du poids sec des disques de feuilles, au moment de leur prélèvement. On remarque que les disques ont un poids sec d'autant plus grand qu'ils proviennent de feuilles plus âgées. Les nécessités expérimentales nous obligent à prélever des disques sur des feuilles d'âge différent mais on voit finalement que l'écart par rapport à la moyenne est faible et non significatif. On remarque que les disques ont accru leur poids frais

de 58 mg au bout de sept jours et que le poids sec n'a pratiquement pas varié. Quelle est alors la signification physiologique de la croissance des disques?

TABLEAU V

Valeur des poids frais et sec de disques de feuilles prélevés à des endroits différents de la tige

Numérotation des feuilles à partir de la base de la tige	POIDS FRAIS moyenne de 8 disques (en mg)	POIDS SEC moyenne de 8 disques (en mg)
1	284	26
2	282	21,7
3	314	20,5
4	325	20,2
	moyenne : 301	moyenne : 22,2

Elle peut être due à des divisions cellulaires; mais celles-ci sont sans doute peu importantes, car elles restent localisées aux zones cambiales des nervures. Il ne semble pas, en effet, que les cellules du parenchyme foliaire soient le siège de phénomènes mitotiques.

Par contre, la grande augmentation du diamètre des disques rend vraisemblable l'intervention des phénomènes de pénétration de l'eau dans la croissance des cellules, et permet de comprendre les déformations dont les disques sont coutumiers à la fin de leur survie, déformations rendant souvent l'évaluation de leur diamètre délicate.

Des expériences ultérieures nous permettront de préciser ces notions.

EN RÉSUMÉ : les phénomènes de croissance apparaissent différents dans les cultures de tissus et chez les disques de feuilles et ce terme est donc en relation avec une notion dont il convient de préciser les coordonnées toutes les fois qu'il en est question.

Pour les buts que nous nous sommes proposés l'évaluation de la croissance par l'expression d'un changement de poids ou de dimensions n'est pas suffisante; c'est ainsi que l'étude des variations des constituants cellulaires fondamentaux (N.P., N.S., A.R.N. et A.D.N.) au cours de la croissance semble indispensable.

2° VARIATIONS DES CONSTITUANTS BIOCHIMIQUES DE LA CELLULE AU COURS DE LA CROISSANCE DES CULTURES DE TISSUS ET DES DISQUES DE FEUILLES.

On distinguera trois sections dans cette étude :

— L'N.P. et l'N.S. dans les cultures et dans les disques;
— Les A.R.N. dans les cultures et dans les disques;
— Les A.D.N. dans les cultures et dans les disques.

a) *L'azote protéique et l'azote soluble*

— *Dans les cultures de tissus.*

Nous avons repris une expérience identique à celle décrite au paragraphe précédent mais l'étude de la croissance pondérale a été complétée par celle des constituants biochimiques. Les résultats indiqués sont ceux d'une expérience effectuée avec des colonies de tissus non virosés. Ils sont identiques à ceux que nous avons obtenus avec des cultures de tissus virosés.

On voit (fig. 10, p. 91) que les diverses souches de tissus de Tabac ont un comportement parallèle, en ce qui concerne l'N.P. Les différences observées se manifestent à la fin du premier mois de croissance : le lait de coco provoque une augmentation de la protéogénèse, mais qui est faible en valeur absolue.

Des mesures effectuées sur des cultures de Crown-Gall âgées de deux mois ont donné une moyenne de 1 752 mg de N.P. par colonie : le pouvoir de synthèse protéique de cette souche est globalement aussi actif que celui des autres.

L'étude des variations du rapport N.P./poids frais montre que ce rapport est élevé au trentième jour de culture (1,200 pour les tissus accoutumés) puis fléchit ensuite très sensiblement (0,530 au bout du troisième mois).

Les tissus de Crown-Gall ont donné au bout de deux mois de croissance un rapport égal à 1,510, rapport qui a une valeur double de celle obtenue pour les colonies de tissus accoutumés sur milieu de base normal.

En somme, on voit que :

— La synthèse d'N.P. est surtout active au cours des deux premiers mois de culture; le maximum étant atteint plus ou moins rapidement suivant les souches. Cette synthèse coïncide avec la phase dynamique de la croissance.

— Après deux mois de culture s'amorce une stabilisation en valeur absolue et même une diminution de l'N.P. : or, entre le deuxième et le troisième mois, le poids frais des colonies continue à grandir, les phénomènes d'accroissement l'emportent alors sur ceux de multiplication.

— Le lait de coco exalte la synthèse protéique. Il agit donc au niveau de la phase de multiplication, mais la faible valeur prise ensuite par le rapport N.P./poids frais, tend à indiquer qu'il agit aussi sur la phase d'accroissement en exaltant sans doute la synthèse des substances inertes. Ces résultats concordent dans leurs grandes lignes avec ceux obtenus par Lioret (1955) sur les tissus de Scorsonère.

En résumé, l'évolution de l'N.P. montre que la croissance comporte à la fois les phénomènes de multiplication et d'accroissement cellu-

laires, ces derniers pouvant se poursuivre alors que les premiers ont beaucoup diminué ou cessé. Ceci est en accord avec les résultats de Lance (1957) travaillant sur d'autres tissus.

D'autre part, les tissus de Crown-Gall et accoutumés ont vis-à-vis de l'N.P. un comportement identique. L'évolution de l'N.S. au cours de la croissance n'a pas apporté d'éléments nouveaux aux faits observés.

Quant au poids sec, Lance (1957) a montré qu'il était un critère de croissance insuffisant. A part deux ou trois essais préliminaires qui nous ont montré les difficultés de son emploi dans nos conditions expérimentales, nous ne l'avons pas calculé.

— *Dans les disques de feuilles.*

Afin de suivre l'évolution de l'N.P. et l'N.S. dans les disques de feuilles, nous avons utilisé des lots de feuilles d'âge aussi semblable que possible. Nous avons prélevé au départ, sur une moitié des feuilles utilisées, des disques afin d'évaluer leurs constituants biochimiques. Des lots de disques ont été disposés à la lumière, leurs correspondants étant disposés à l'obscurité.

Au cours d'expériences préliminaires, nous avons étudié le comportement des disques en survie dans l'eau distillée et dans du Knop au demi; c'est dans l'eau distillée que les phénomènes mis en évidence sont les plus nets et les plus intéressants si l'on considère nos nécessités expérimentales ultérieures. Les figures 11 et 12 résument les résultats obtenus dans ces conditions.

On voit que :

— La mise en survie s'accompagne d'une intense lyse protéique. Cette lyse est plus rapide à la lumière qu'à l'obscurité, mais elle cesse rapidement à la lumière et la synthèse protéique reprend, dans ce dernier cas, peut être aux dépens des réserves d'N nitrique des cellules, mais sans doute aussi à partir des métabolites azotés libérés au moment de la lyse protéique.

A l'obscurité, les phénomènes de lyse continuent à l'emporter sur les phénomènes de synthèse, mais un équilibre tend à s'instaurer. Les différences trouvées entre le comportement des disques à la lumière et à l'obscurité sont significatives.

— L'étude des variations de l'azote soluble complète celle des variations de l'N.P. L'N.S. monte régulièrement à l'obscurité, bien que la pente de la courbe diminue très sensiblement après quatre-vingt-seize heures de survie. L'azote soluble tend à être moins abondant à la lumière qu'à l'obscurité surtout en fin de survie.

On remarque, d'après les courbes, qu'en fin de survie, l'N total est très voisin de ce qu'il était au départ.

Lorsque le milieu de survie est du Knop au demi, nous avons retrouvé des résultats identiques à ceux de Commoner et *al.* (1953) qui travaillaient dans des conditions très voisines des nôtres. Cepen-

dant on doit noter qu'après sept jours de survie les disques disposés dans du Knop contiennent davantage d'N.P. que ceux disposés dans l'eau distillée. Ainsi, au cours d'une expérience où des disques, prélevés sur les moitiés correspondantes des feuilles, ont été disposés les uns dans l'eau distillée et les autres dans du Knop au demi pendant sept jours à la lumière, les chiffres d'N.P. trouvés pour un disque ont été :

Au départ	2,06 mg
Après sept jours de survie à la lumière dans du Knop au demi	1,91 mg
Après sept jours de survie dans l'eau distillée	1,62 mg

En résumé, les disques subissent au moment de leur mise en survie un « choc » lié sans doute aux phénomènes traumatiques qui accompagnent le prélèvement et qui se traduit par une lyse protéique brutale durant les deux premiers jours. Nos résultats sont en accord avec ceux qui ont été obtenus dans des conditions différentes par d'autres auteurs, bien que l'étude systématique dans l'eau distillée n'ait pas été faite (Vickery et *al.*, 1937; Yemm, 1937; Commoner et *al.*, 1953).

b) *Les acides ribonucléiques*

b 1) *Les acides ribonucléiques dans les cultures de tissus.*

Les figures 13, 14 et 15 montrent l'évolution des A.R.N. au cours de la croissance de cultures de tissus accoutumés.

Les courbes montrent que la synthèse d'A.R.N. est très active dans les vingt premiers jours de la croissance. Elle cesse ensuite et le taux d'A.R.N., en valeur absolue, diminue. Ce phénomène est confirmé par l'étude des courbes 14 et 15. Si on les compare avec les courbes 10 et 13, un décalage important est à noter entre les synthèses respectives d'A.R.N. et d'N.P., les premières atteignant rapidement leur maximum.

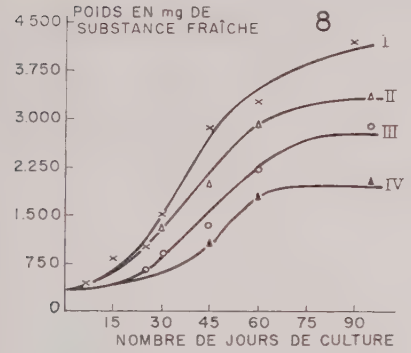
Le fait que la synthèse des A.R.N. démarre plus vite que celle des protéines est en accord avec les vues généralement admises sur le contrôle de la synthèse des protéines par les A.R.N. Enfin, la synthèse active d'A.R.N. correspond à la phase de multiplication des cellules,

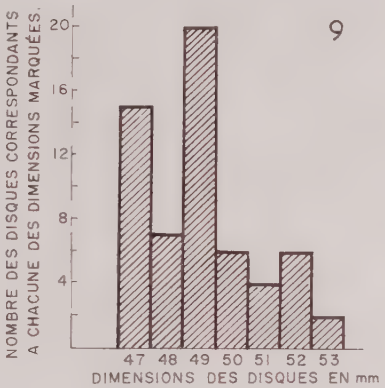
---

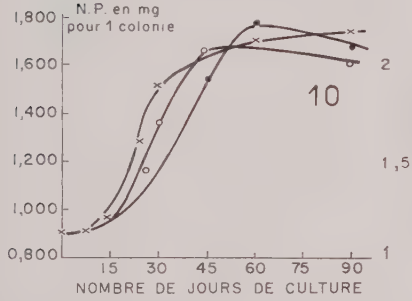
Légendes de la planche

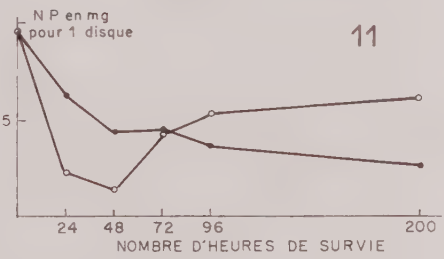
Fig. 8 : I. Tissu accoutumé + 10 % lait de coco (35 g de saccharose).
II. Tissu accoutumé (50 g de glucose).
III. Tissu accoutumé (35 g de saccharose).
IV. Crown-Gall (35 g de saccharose).

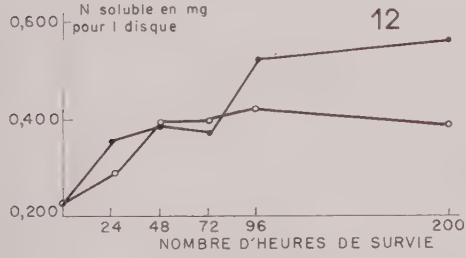
Fig. 9 : Étude de l'augmentation de diamètre de disques de feuilles de Tabac en survie dans du Knop au demi à la lumière pendant sept jours.











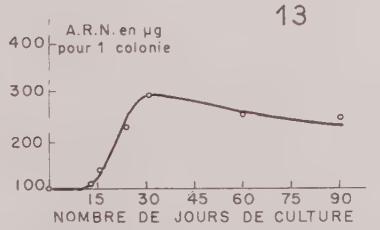


FIG. 10 : Évolution de la teneur en N.P. de colonies de tissus de Tabac au cours de leur croissance :

× Tissus de Tabac sur 10 % de lait de coco.
○ Tissus accoutumés sur 35 g de saccharose.
● Tissus accoutumés sur 50 g de glucose.

FIG. 11 : Évolution de l'N.P. de disques de feuilles de Tabac en survie dans l'eau bidistillée :

○ Disques disposés à la lumière.
● Disques disposés à l'obscurité.

FIG. 12 : Évolution de l'N.S. de disques de feuilles de Tabac en survie dans l'eau bidistillée :

○ Disques disposés à la lumière.
● Disques disposés à l'obscurité.

FIG. 13 : Évolution des A.R.N. au cours de la croissance de tissus accoutumés de Tabac poussant sur du Knop au demi + 35 g de saccharose.

l'indépendance relative des phénomènes de multiplication et d'accroissement se confirme.

Par ailleurs, le tissu de Crown-Gall contient deux fois plus d'A.R.N. ramené au poids frais que les tissus accoutumés. Par contre, leur teneur en A.R.N. est identique si on les ramène à l'N.P. La souche de tissus accoutumés poussant sur 50 g de glucose s'est révélée être sensiblement plus riche en A.R.N. que les autres souches (288 µg par mg d'N.P.).

b 2) *Les acides ribonucléiques dans les disques de feuilles.*

La courbe 16 montre que la teneur en A.R.N. baisse sensiblement au début de la mise en survie. La chute des A.R.N. cesse au bout du troisième jour, puis il s'amorce une remontée faible mais continue. Les phénomènes de lyse des A.R.N. sont sensiblement identiques à la lumière et à l'obscurité, les différences trouvées n'étant pas significatives.

En somme, comme les protéines, les A.R.N. subissent une lyse consécutive au phénomène de choc du prélèvement; cette lyse est proportionnellement moins intense que celle subie par les protéines, mais la resynthèse est moins importante.

Une certaine indépendance existe entre le comportement des A.R.N. et celui des protéines au moment du choc.

Personne ne semble avoir étudié jusqu'alors, à notre connaissance, le comportement de la lyse des A.R.N. dans des disques de feuilles.

Cependant, il est possible de déduire l'existence de faits analogues en interprétant les résultats de Basler et Commoner (1956) à propos d'une expérience faite dans un tout autre but. Des résultats analogues sont retrouvés si les disques sont mis en survie dans du Knop au demi et les courbes ne diffèrent pas sensiblement de celles que nous venons de donner.

c) *Les acides désoxyribonucléiques*

L'intérêt des A.D.N. réside dans le fait que leur synthèse est généralement liée à des divisions cellulaires; ils permettent de pénétrer davantage dans l'intimité des phénomènes de croissance.

c 1) *Les acides désoxyribonucléiques dans les cultures de tissus.*

La figure 17 montre que la synthèse des A.D.N. est rapide, que son maximum est atteint un peu avant celui des A.R.N. (fig. 13) et quelle précède celle de tous les autres constituants cellulaires. Les A.D.N. restent stables après vingt-cinq jours de culture, ce qui implique que le taux des divisions cellulaires baisse considérablement après ce moment. Ces phénomènes ont été régulièrement retrouvés (cf. 2e partie, chapitre II).

Par ailleurs, des mesures effectuées sur les autres tissus étudiés ont montré que les tissus de Crown-Gall contiennent deux fois plus d'A.D.N. rapporté au poids frais que les tissus accoutumés, par contre, leur

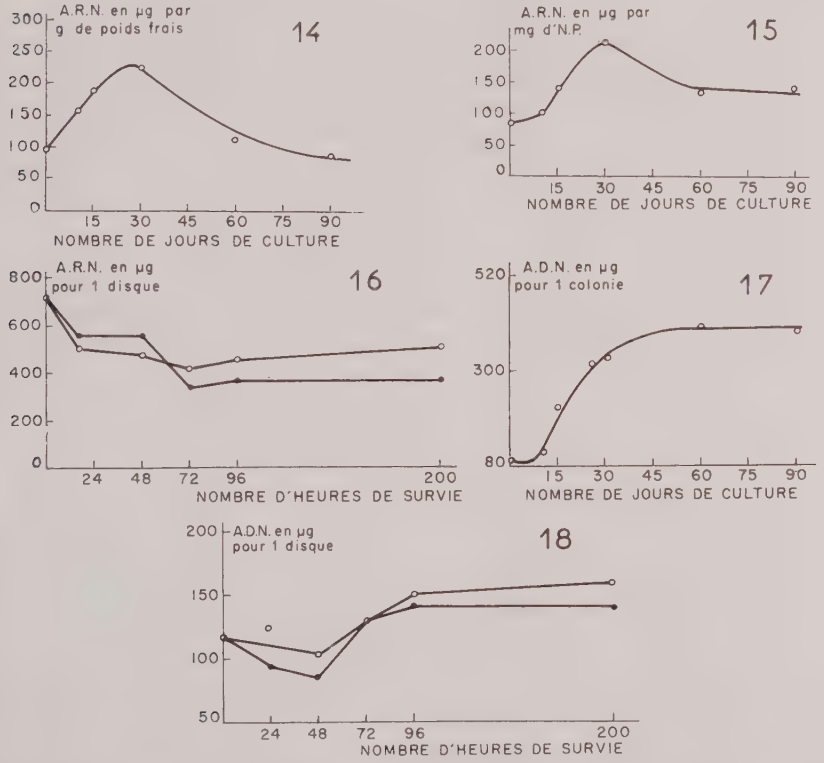


Fig. 14 : Évolution des A.R.N. en fonction du poids frais, au cours de la croissance de tissus accoutumés de Tabac poussant sur Knop au demi + 35 g de saccharose.

Fig. 15 : Évolution des A.R.N. en fonction de l'N.P. au cours de la croissance de tissus accoutumés de Tabac poussant sur Knop au demi + 35 g de saccharose.

Fig. 16 : Évolution de la teneur en A.R.N. de disques de feuilles de Tabac en survie dans l'eau bidistillée :

○ Disques disposés à la lumière.
● Disques disposés à l'obscurité.

Fig. 17 : Évolution de la teneur en A.D.N. de cultures de tissus accoutumés de Tabac sur Knop au demi + 35 g de saccharose.

Fig. 18 : Évolution de la teneur en A.D.N. de disques de feuilles de Tabac en survie dans l'eau distillée :

○ Disques disposés à la lumière.
● Disques disposés à l'obscurité.

teneur est la même si on la rapporte à l'N.P.; que les tissus poussant sur lait de coco sont plus riches en A.D.N. que ceux n'y croissant pas. L'étude des rapports A.R.N/A.D.N. montre une richesse relative des cultures de tissus en A.D.N. Ce rapport est toujours inférieur à 1, ce qui est tout à fait exceptionnel si l'on songe que les résultats obtenus avec les bactéries, les tissus animaux et divers autres tissus végétaux ont toujours donné des valeurs supérieures à 1; ainsi, dans le cas des disques de feuilles, le rapport A.R.N./A.D.N. varie entre 4 et 5. Cependant, il semble vraisemblable d'admettre que la richesse relative des cultures de tissus en A.D.N. est davantage la conséquence de leur pauvreté en A.R.N. que d'une valeur élevée de leur teneur en A.D.N. Ces faits ne semblent pas avoir été signalés.

Par ailleurs, les valeurs du rapport A.R.N./A.D.N. sont voisines pour les tissus de Crown-Gall et les tissus accoutumés poussant sur lait de coco : elles sont plus faibles que celles des tissus accoutumés croissant sur milieu de base normal. Ceci implique une richesse relative en A.D.N. des tissus étudiés.

Les considérations précédentes montrent que le métabolisme des A.D.N. présente une indépendance relative par rapport à celui des autres constituants biochimiques de la cellule.

c 2) *Les acides désoxyribonucléiques dans les disques de feuilles.*

La figure 18 montre une chute de la teneur des disques en A.D.N. au début de la survie. Cette chute est suivie, quarante-huit heures après, d'une synthèse sensible d'A.D.N. aboutissant à une teneur des disques plus élevée à la fin de la survie qu'au moment du prélèvement. Il est difficile d'interpréter ce phénomène qui est légèrement accentué quand le milieu de survie est du Knop au demi. En effet, il est peu vraisemblable qu'il soit en liaison avec un nombre élevé de divisions cellulaires; les zones cambiales des nervures sont peu importantes et l'on n'a jamais observé de mitoses au niveau des tissus lacuneux et palissadiques du parenchyme foliaire. D'autre part, les synthèses d'A.R.N. et de protéines suivent, dans le même temps, une évolution contraire à celle des A.D.N.

Il faut donc admettre qu'une synthèse d'A.D.N. est possible en absence de divisions cellulaires. A première vue ce fait peut paraître surprenant, mais dans un domaine tout différent, Spiegelmann (1957) a montré qu'une synthèse d'A.D.N. dans de telles conditions existait chez les protoplastes bactériens obtenus à l'aide du lysozyme. Ce résultat nécessitera, pour être expliqué, des recherches ultérieures.

Enfin, le comportement particulier des A.D.N. confirme l'indépendance de leur métabolisme par rapport à celui des A.R.N. et permet par surcroît d'avoir une idée du degré de survie des disques de feuilles à la fin de l'expérience : les disques lésés ont un taux d'A.D.N. plus faible qu'au départ. On peut les éliminer ainsi en toute certitude.

Les conclusions suivantes peuvent être dégagées des résultats exposés plus haut.

1° La croissance des cultures de tissus en dehors de la latence et de la sénescence présente deux phases essentielles. Ces deux phases peuvent être définies par l'étude des variations du poids frais au cours de la croissance, mais elles peuvent l'être aussi en fonction des fluctuations de certains constituants biochimiques cellulaires. Ces substances présentent toujours une phase de synthèse active, suivie d'une phase de stabilisation, voire d'une lyse plus ou moins considérable. Mais si ces phases se distinguent quel que soit le constituant biochimique envisagé, elles ne se situent pas pour tous aux mêmes moments : il existe entre le comportement des diverses substances considérées un décalage dans le temps qui implique une dépendance de ces substances les unes par rapport aux autres. En effet, la stabilisation des protéines et même leur lyse est effective alors que la croissance pondérale est encore active. De même, les A.R.N. ont cessé d'augmenter alors que l'N.P. continue à augmenter activement. C'est également vrai pour les A.D.N. par rapport aux A.R.N.

Ainsi, lorsqu'on définit une phase de croissance il faut avoir soin d'indiquer à quel critère on la ramène. Nous avons, en ce qui nous concerne, adopté l'N.P. dont les variations sont voisines de celles du poids frais.

2° Les disques de feuilles en survie grandissent, mais il est évident que dans ce cas il s'agit davantage d'un phénomène d'accroissement que d'une croissance authentique.

3° Les constituants biochimiques des disques de feuilles et des cultures de tissus ont, quelles que soient les conditions de survie, des comportements opposés. Le phénomène de choc libère dans les disques les produits de la lyse des protéines et des A.R.N. Ces substances sont donc éventuellement mobilisables pour un métabolisme adjuvant ; par contre, dans les cultures, les potentialités des cellules et du milieu semblent surtout servir à la croissance. Un métabolisme parasite ne trouvera donc pas des conditions identiques dans les tissus et dans les feuilles pour s'installer.

Les cultures de tissus apparaissent pour un même poids frais, trois et demie à huit fois plus pauvres en protéines que les disques. Le matériel inerte des cultures est donc très important. Les A.R.N. sont de onze à vingt-cinq fois plus abondants dans les feuilles que dans les cultures si on les rapporte au poids frais, mais ramenés à l'N.P. on en trouve seulement deux fois et demie plus.

Le cas des A.D.N. est assez particulier. Il y a en effet deux fois et demie plus d'A.D.N. dans les feuilles si on les ramène à l'unité de poids frais, mais si on les exprime en fonction de l'N.P., les cultures de tissus sont plus riches que les feuilles. Les A.D.N. exprimés en

fonction de l'N.P. prennent ainsi leur signification physiologique; on comprend alors l'intérêt de l'N.P. comme coordonnée de référence.

En résumé : nous avons confirmé et complété certains faits mis en évidence sur des matériels et dans des conditions différentes des nôtres.

Par ailleurs, nous avons montré :

— Que les A.R.N. subissent dans les disques en survie une lyse faible;
— Que les disques de feuilles en survie dans l'eau bidistillée ou dans du Knop au demi sont susceptibles d'effectuer, aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité, une importante synthèse d'A.D.N.;
— Que les cultures de tissus sont riches en A.D.N. et paraissent ainsi pauvres en A.R.N. et corrélativement en N.P.

Chapitre II

MULTIPLICATION DU VIRUS DE LA MOSAIQUE DU TABAC EN CULTURE DE TISSUS ET EN DISQUES DE FEUILLES : RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

La connaissance du comportement physiologique des cultures et des disques nous a permis d'aborder les problèmes de la multiplication du V.M.T. dans ces matériels.

Si l'on considère que seuls les travaux de White (1934), Segretain (1948), Morel (1948) et de Augier de Montgremier et Morel (1948) avaient été publiés au moment où ce travail a été entrepris, on voit que la multiplication des virus en culture de tissus n'avait donné lieu qu'à peu de recherches. Cependant, au cours de la réalisation de notre travail et indépendamment des nôtres, un certain nombre de publications ont paru : Kutsky et Rawlins (1950), Kutsky (1952), Segretain (1952), Hildebrand et Riker (1952, 1953, 1954, 1955). Certains des auteurs cités ont travaillé soit sur le développement du V.M.T. en culture de tissus (Hildebrand et Riker) ou dans les cals primaires formés à l'apex de fragments de tige (Kutsky et Rawlins), soit sur l'action de substances diverses (Segretain) sur la multiplication du V.M.T., mais les rapports entre la multiplication du V.M.T. et la physiologie du matériel utilisé n'ont pas été étudiés. Il faut enfin signaler qu'au cours de la rédaction de ce mémoire nous avons eu connaissance, début 1958, d'une publication de Kassanis (1957) dans laquelle, outre les problèmes nouveaux qu'il aborde, il confirme la

plupart des résultats que nous avions publiés en 1956 avec G. Segretain (Hirth et Segretain, 1956).

Si la multiplication du V.M.T. en culture de tissus a fait l'objet d'un nombre restreint de recherches, il n'en est pas de même pour les disques de feuilles. Certes, il semble qu'aucun auteur n'ait entrepris un travail dans le genre du nôtre, mais les feuilles isolées ou les disques de feuilles ont été utilisés abondamment pour résoudre un grand nombre de problèmes relatifs à la multiplication du V.M.T. Purdy Beale (1928) a été le premier à montrer que le virus se multipliait dans les feuilles isolées. Takahashi, utilisant dès 1947 la technique de Vickery et *al.* (1937), a employé systématiquement les disques de feuilles en survie pour tenter d'établir les rapports pouvant exister entre l'infection et les modifications de la respiration. Plus tard, Commoner et *al.* (1950) ont abordé par ce procédé des problèmes divers concernant la multiplication du V.M.T.

I. Les étapes de la multiplication du V.M.T. : ses liens avec les éléments biochimiques cellulaires

A. La multiplication du V.M.T. exprimée en fonction du poids frais.

1° Dans les cultures de tissus.

Nous avons réalisé une série d'expériences identiques à celles que nous avons décrites à propos de la croissance des tissus accoutumés de tabac (2e partie, chapitre I), mais sur des tissus virosés.

a) *Fixité de la teneur en virus au cours de la vie des cultures de tissus.*

Il s'agissait de savoir si la teneur en virus des cultures subissait d'importantes modifications au cours des nombreux repiquages effectués durant notre travail. Le tableau ci-après montre que pour des cultures d'âge comparable (soixante-quinze à quatre-vingt-dix jours) la teneur par gramme de poids frais est pratiquement constante. Ce fait qui avait déjà été indiqué (Hirth et Segretain, 1956) a été confirmé par Kassanis (1957). Cependant, nous avons constaté que certains lots de colonies contenaient très sensiblement plus de virus que d'autres (deux fois plus), mais au bout de deux ou trois repiquages le taux de virus se rapprochait de la moyenne normalement obtenue. Nous n'avons aucune explication satisfaisante à donner à ce phénomène qui semble aussi avoir été vu par Kassanis (1957). Cet auteur a trouvé en effet des variations sensibles dans la teneur en virus des colonies; il attribue ces variations au fait que ses cultures n'étaient pas effectuées à température constante : cette dernière subissant les variations saisonnières. Cette interprétation semble peu satisfaisante d'autant plus que les différences de concentrations trouvées par l'auteur anglais sont considérables.

Tableau VI

Fixité de la teneur en V.M.T. des cultures de tissus de tabac au cours des repiquages successifs effectués sur plusieurs années

DATES	µg de V.M.T. par gramme de poids frais pour des cultures âgées de 75 à 90 jours
Mars 1954	125
Novembre 1955....	170
Juillet 1956	180
Juin 1957	160

En ce qui nous concerne, d'ailleurs, la température ne pouvait jouer puisque nos cultures étaient effectuées dans une pièce thermostable (20 °C).

Quoi qu'il en soit, la teneur en V.M.T. des cultures de tissus est suffisamment constante dans des lots déterminés pour permettre la mise en évidence de différences significatives.

b) *La croissance des cultures et leur teneur en V.M.T.*

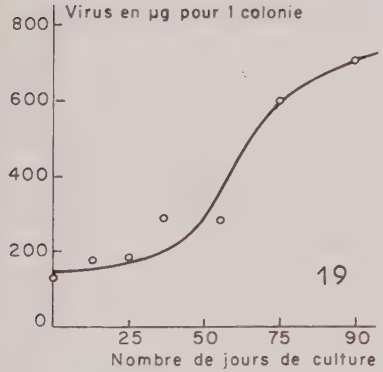
Les figures 19 et 20 montrent nettement que la quantité de virus contenue dans les colonies varie au cours de la croissance. Si cette teneur est exprimée en fonction du poids frais, on voit qu'elle diminue pendant « la phase de multiplication », pour augmenter pendant la phase dite « d'accroissement ». C'est au moment où la croissance est la plus active que la multiplication du virus semble la plus faible.

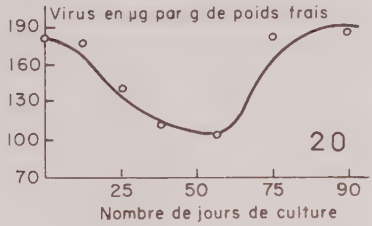
Par ailleurs, une expérience effectuée sur 20 colonies de tissus accoutumés de Tabac cultivés pendant quatre mois et demi dans les conditions habituelles a montré que le titre du virus était comparable (169 µg) à celui obtenu après soixante-quinze jours de croissance. Les colonies continuent à croître faiblement, mais d'importantes plages nécrotiques apparaissent.

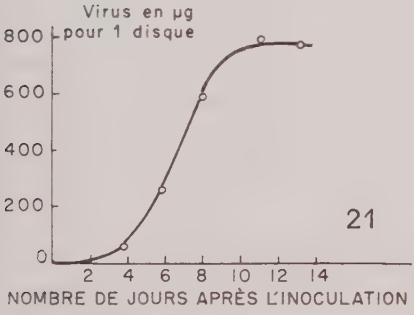
2° Dans les disques de feuilles.

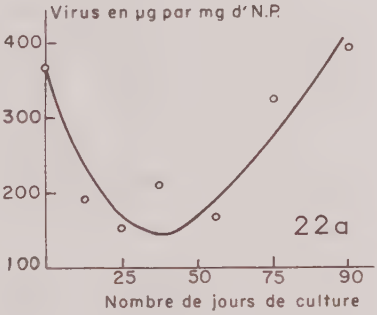
Il s'agissait, dans ce cas, de nous assurer que dans nos conditions expérimentales la multiplication du virus dans les disques de feuilles s'effectuait bien suivant une courbe analogue à celles déjà décrites par Commoner et *al.* (1950) et par Backus (1952). Des feuilles ont été inoculées et des disques, prélevés dans les conditions habituelles, sont disposés à la lumière dans du Knop au demi. Huit lots de deux disques ont été prélevés à chacun des intervalles indiqués par la figure 21 et les mesures des constituants biochimiques et du virus effectuées.

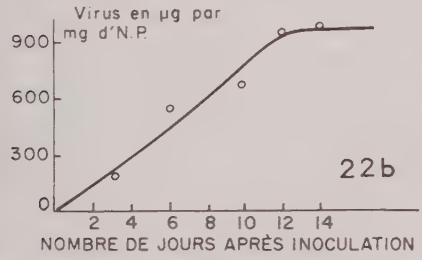
Les résultats des auteurs cités ont été retrouvés, bien que les conditions expérimentales et les modes de titrage aient été différents. On voit en effet (fig. 21) que la multiplication du V.M.T. s'effectue











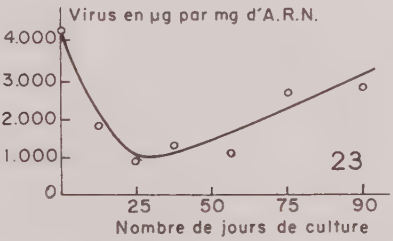


FIG. 19 : Évolution de la teneur en virus d'une colonie de tissu accoutumé de Tabac croissant sur Knop au demi + 35 g de saccharose.

FIG. 20 : Évolution de la teneur en V.M.T. exprimée en fonction du poids frais de colonies de tissus de Tabac accoutumés croissant sur Knop au demi + 35 g de saccharose.

FIG. 21 : Multiplication du V.M.T. à la lumière dans des disques en survie dans du Knop au demi pendant treize jours.

FIG. 22 *a* : Évolution de la teneur en virus en fonction de l'N.P. de colonies de tissus accoutumés de Tabac croissant sur Knop au demi + 35 g de saccharose.

FIG. 22 *b* : Évolution du rapport virus/N.P. au cours de la multiplication du V.M.T. dans des disques de feuilles isolées, en survie à la lumière dans du Knop au demi.

FIG. 23 : Évolution de la teneur en virus en fonction des A.R.N. de colonies de tissus accoutumés de Tabac croissant sur Knop au demi + 35 g de saccharose.

suivant une courbe exponentielle et que le taux maximum de V.M.T. est atteint après onze jours de survie.

On constate que la phase active de la multiplication se situe entre le cinquième et le huitième jour de la survie. D'autre part, au-delà du huitième jour, on voit apparaître, même dans un milieu dépourvu de substances carbonées, des infections internes chez certains disques. Ceci est dû au fait que nos plantes ne sont pas cultivées stérilement et que le traumatisme qui accompagne le prélèvement favorise les infections. Toutes ces considérations ont fait que nos expériences sur la multiplication du V.M.T. dans les disques de feuilles n'ont presque jamais dépassé sept à huit jours.

A l'occasion d'expériences de types différents, dans d'autres conditions, des courbes d'aspect analogue à celles de la figure 21 ont été retrouvées; toutefois, les valeurs absolues varient sensiblement d'une expérience à l'autre. C'est ainsi que le V.M.T. se multiplie moins à la lumière qu'à l'obscurité et que le glucose et les sels minéraux favorisent son développement. Tous ces faits sont classiques (cf. Bawden *in* « Plant viruses and viruses diseases », 1953) et ont été retrouvés régulièrement (Hirth, Galzy et Slizewicz, 1957).

B. La multiplication du V.M.T. et l'N.P.

1° Dans les cultures de tissus.

La figure 22 *a* montre que les variations de la teneur en V.M.T., exprimées en fonction de l'N.P. au cours de la croissance, présentent une analogie avec ce qui a été vu en prenant le poids frais comme coordonnée de référence. La synthèse du V.M.T. est en effet particulièrement faible pendant la période où la teneur en N.P. par gramme de poids frais est la plus élevée. La synthèse du virus est surtout active pendant la période durant laquelle le taux en N.P. a tendance à diminuer. Il semble donc qu'il y ait antagonisme entre la synthèse de l'N.P. normal et celle du V.M.T.

2° Dans les disques de feuilles.

La figure 22 *b* montre que le rapport V.M.T./N.P. croît régulièrement au fur et à mesure de la multiplication du V.M.T. Ce résultat découle, d'une façon évidente, à la fois du comportement vis-à-vis de l'N.P. des disques en survie et de l'allure exponentielle de la multiplication du V.M.T. dans ces disques.

C. La multiplication du V.M.T. et les acides nucléiques

1° Dans les cultures de tissus.

La courbe 23 a une allure générale voisine de celle de la courbe 22, mais elle atteint son minimum plus rapidement (vers le vingt-cinquième

jour de culture). Ceci est la conséquence du décalage que nous avons signalé entre l'évolution des divers constituants biochimiques au cours de la croissance des cultures de tissus.

L'indépendance relative du métabolisme des A.D.N. par rapport aux autres constituants cellulaires rend sans grand intérêt l'étude du rapport A.D.N./virus : la courbe a d'ailleurs une allure générale identique à celle obtenue avec les A.R.N. et l'N.P.

2° Dans les disques de feuilles.

Le rapport virus/A.R.N. croît régulièrement au fur et à mesure que le virus se multiplie. Son étude ne présente guère d'intérêt sous cet aspect.

Quant au rapport virus/A.D.N., il apporte peu d'éléments à la compréhension des phénomènes étudiés.

Conclusion : ces recherches montrent que le virus se multiplie d'une façon très différente qualitativement et quantitativement dans les disques de feuilles et dans les cultures de tissus. Nous avons vérifié que le V.M.T. se multipliait dans les disques de feuilles suivant une courbe exponentielle; par contre, en culture de tissus, nos résultats montrent que la teneur en virus exprimée en fonction du poids frais n'est pas constante au cours des diverses phases de la croissance : à la multiplication active des cellules correspond une phase où la concentration relative en virus est plus faible. Pendant le troisième mois de culture la multiplication du V.M.T. est la plus forte. Si par conséquent on repique des colonies après deux mois de culture, c'est-à-dire à un moment où le taux de V.M.T. est le plus bas, on risque de ne pas voir les fluctuations de la teneur en virus. Celles-ci sont faibles en valeurs absolues et les différences deviennent peu visibles ou ininterprétables. C'est pourquoi Kassanis n'a pas observé de différences significatives dans la teneur en virus au cours de la croissance des tissus de Crown-Gall de Tabac qu'il a utilisés.

Par ailleurs, sur une base de poids frais, on peut calculer que les cultures de tissus contiennent treize fois moins de virus par gramme que les disques de feuilles, si on considère les colonies après soixante-quinze jours de croissance. Par contre, on a vu qu'après deux mois de culture elles en contiennent de trente à quarante fois moins. Ce résultat est conforme à ceux de Morel (1948) et les précise; ils avaient été exposés dans un mémoire de 1956 (Hirth et Segretain), Kassanis (1957) les a confirmés : l'étude des constituants biochimiques des feuilles et des cultures peut apporter des éléments intéressants pour comprendre les raisons de cette différence de comportement des cultures et des disques de feuilles vis-à-vis du V.M.T.

En considérant l'N.P. on est tenté d'établir un lien entre la faible teneur des cultures de tissus en N.P. d'une part et en V.M.T. d'autre

part. On pourrait penser que cette pauvreté en N.P. est en rapport avec le caractère proliférant des cultures de tissus, mais les recherches d'Ogur et Rosen (1950) ont montré que les méristèmes de Pois ou d'Oignon étaient riches aussi bien en N.P. qu'en A.R.N. Les cultures de tissus apparaissent ainsi comme un matériel ayant son originalité physiologique et biochimique propre et dont le pouvoir de synthèse en matériel inerte est très élevé.

Si on utilise les résultats exprimés par les courbes précédentes, on voit que les feuilles contiennent de trois à cinq fois plus de virus par milligramme d'N.P. que les cultures de tissus au moment où celles-ci atteignent le maximum de leur teneur en protéines. Ainsi les rapports quantitatifs qui s'établissent entre le V.M.T. et l'N.P. ne sont pas les mêmes dans les deux types de matériels étudiés. Ce fait peut être interprété de plusieurs façons : ou bien l'N.P. des cultures de tissus caractérise un matériel vivant ayant des possibilités plus faibles de participer à un métabolisme parasite que celui des disques, ou bien les besoins des colonies pendant les phases de multiplication sont tels que la synthèse du virus s'en trouve ralentie. Il s'agirait en somme, dans ce cas, d'une inhibition compétitive de la multiplication du V.M.T.; cette seconde hypothèse paraît à priori la plus vraisemblable. On pourrait aussi faire intervenir la diffusion du virus dans les cellules nouvellement formées des cultures de tissus. En effet, on sait que les tissus accoutumés de Tabac sont formés par de nombreux massifs cellulaires de type méristématique noyés au milieu de cellules plus grandes, bourrées de grains d'amidon. Si l'on admet que les méristèmes primaires des plantes infectées par des virus contiennent peu (Bennet, 1934) ou pas de virus (Limasset, 1949; Holmes, 1955 *a*-1955 *b*), il faudra que celui-ci diffuse des cellules qui contiennent le virus vers celles qui viennent d'être formées. Il est évident que pendant la phase active de la croissance, il peut s'effectuer un décalage entre l'intensité de la protéogénèse liée à l'apparition de nouvelles cellules et la multiplication du V.M.T., celle-ci apparaissant comme relativement plus faible dans les périodes de multiplication. La vérification d'une telle hypothèse exige qu'on puisse localiser le virus dans les cellules. Nous avons tenté de l'effectuer en utilisant sur des coupes fixées la réaction de Sakaguchi telle que la préconise Rawlins (1956). Ces essais se sont soldés par un échec.

Enfin, on peut montrer que le V.M.T. représente, par rapport aux protéines totales des pourcentages très différents suivant qu'il s'agit de cultures de tissus ou de disques de feuilles. Dans le cas des feuilles, le pourcentage de V.M.T. par rapport aux protéines totales est de l'ordre de 20 % : cette valeur est en accord, quoique un peu plus faible, avec celle trouvée sur des plantes entières (cf. Bawden, 1953, « Plant virus and virus diseases »). Par contre, dans les cultures de tissus, la proportion de protéine virale ne représente que 2,5 % environ des

protéines totales des colonies tissulaires. Cette différence est très faible et explique que nous n'ayons jamais pu mettre en évidence de différence significative dans la teneur en N.P. des cultures de tissus virosés et non virosés.

Tableau VII

Évaluation du pourcentage de l'A.R.N. du V.M.T. par rapport aux A.R.N. totaux dans les disques prélevés sur des feuilles de Tabacs virosés depuis deux mois

Désignation du matériel	A.R.N. totaux en µg pour 1 disque	V.M.T. en µg pour 1 disque	A.R.N. du V.M.T. en µg pour 1 disque (5 %) du V.M.T.	A.R.N. normaux en µg pour 1 disque	% des A.R.N. du virus par rapport aux A.R.N. totaux
n° 1	292	2 120	106	186	36,4
n° 2	204	1 750	88	116	43,0
n° 3	122	725	36	86	29.5
n° 4	238	1 290	65	173	27,3
n° 5	264	1 830	92	172	35,0

En ce qui concerne les A.R.N., le tableau VII montre que dans des disques de feuilles prélevés sur des plantes virosées depuis trois mois, la proportion d'A.R.N. viral par rapport aux A.R.N. totaux peut être considérable. (Comme nous l'avons vu (1re partie, chapitre V) le V.M.T. contient 5 % d'A.R.N., dans cette expérience l'A.R.N. du virus a été évalué sur cette base). Par contre, dans les cultures de tissus, il représente au maximum 5 % de l'A.R.N. total : là encore on ne trouve pas de différences significatives dans la teneur en A.R.N. des cultures virosées et non virosées.

II. La multiplication du V.M.T. et le métabolisme cellulaire

Les observations faites précédemment conduisent à envisager l'origine des fractions protéique et nucléique du V.M.T. Ces fractions sont-elles prélevées sur les protéines et les A.R.N. de l'hôte, ou, au contraire, sont-elles le résultat d'un métabolisme surajouté?

Ce problème a été abordé par de nombreux auteurs mais rarement d'une façon systématique et Limasset (1957), dans une revue récente, soulignait les contradictions auxquelles les recherches entreprises avaient donné naissance. Ce point a été étudié afin de pouvoir interpréter les résultats des expériences déjà réalisées ou que nous nous proposions d'effectuer.

A. Le V.M.T. et les protéines cellulaires

En 1930, Dunlap trouva que la teneur des plantes en glucides et en protéines variait au cours de l'infection virale : les jaunisses provoquant une diminution de l'azote total des plantes et les mosaïques une augmentation. Plus tard, Stanley (1937) a montré que les Tabacs infectés par le V.M.T. donnaient un suc dans lequel les protéines solubles étaient plus abondantes que dans les jus de plantes saines. Il montra également un accroissement considérable de la quantité d'N.P. total dans les plantes virosées. Martin et *al.* (1938) n'ont pas retrouvé les résultats de Stanley en ce qui concerne les protéines totales, pourtant ils ont montré qu'au début de l'infection les protéines diminuaient; dans le même ordre d'idées, Woods et du Buy (1941) prétendirent que la multiplication du virus se faisait aux dépens des chromoprotéines de l'hôte. Au même moment, Spencer (1941) affirmait que la multiplication du V.M.T. n'était possible que si l'hôte recevait un apport supplémentaire d'N. En 1947, Takahashi, en montrant que le V.M.T. pouvait se multiplier dans des feuilles de Tabac détachées, maintenues en survie dans de l'eau distillée, concluait que cette multiplication ne pouvait se faire qu'aux dépens des protéines normales de l'hôte.

Cependant, la diversité des conditions expérimentales ne permettait pas de tirer des conclusions valables des résultats obtenus.

Le problème du rapport des protéines de l'hôte avec le V.M.T. fut abordé en profondeur par Wildman et *al.* (1949) au moyen de l'électrophorèse. Ces auteurs tirèrent des résultats obtenus la conclusion que la synthèse du virus devait se faire aux dépens d'une protéine normale présente dans la fraction soluble de l'ensemble protéique de l'hôte : en effet, les diagrammes électrophorétiques obtenus indiquaient une diminution du pic caractéristique de cette protéine normale au fur et à mesure de l'apparition du virus. Il est à remarquer que dans leur travail les auteurs américains ne se préoccupaient pas de la fraction protéique insoluble de l'hôte. Les conclusions de Wildman et *al.* suscitèrent de nouvelles recherches.

Commoner et *al.* (1953), reprenant un travail effectué par Meneghini et Delwiche (1951) à l'aide de l'N 15 et utilisant la technique des disques isolés, aboutirent aux conclusions suivantes :

1° Le V.M.T. ne se forme pas à partir des acides aminés libres de l'hôte, mais directement à partir des ions ammonium présents dans le milieu.

2° La synthèse du V.M.T. s'accompagne d'une augmentation très nette de la teneur en N.P. total des disques infectés, par rapport aux disques non infectés, cette augmentation étant due à l'apparition du V.M.T. et aussi à celle de protéines non virulentes tant solubles qu'insolubles.

Les conclusions de COMMONER et *al.* sont donc en contradiction avec celles de WILDMAN et *al.* Il était, dans ces conditions, indispensable de reprendre ce travail en vue des buts que nous nous étions fixés.

Résultats expérimentaux.

Pour résoudre ce problème, nous nous sommes adressé aux disques de feuilles. En effet, l'incapacité où nous nous sommes trouvé de mettre en évidence une différence quelconque dans la teneur en N.P. des colonies saines et virosées rendait impossible une telle étude à partir des cultures de tissus. Le dispositif expérimental habituel a subi quelques aménagements.

Des feuilles de Tabacs âgés de trois mois, choisis comme ayant des dimensions et des âges voisins, sont inoculées *in situ* sur l'une de leur moitié avec une suspension de virus concentrée, l'autre moitié étant frottée avec de l'eau distillée; vingt-quatre heures après, les disques sont mis en survie dans du Knop au demi ou dans de l'eau distillée. On a pris les précautions nécessaires pour éviter une contamination quelconque de la moitié non inoculée.

Il n'a pas paru utile de séparer les moitiés de feuilles correspondantes avant leur inoculation, vingt-quatre heures suffisant à peine à l'invasion des cellules épidermiques de la région infectée. (YARWOOD, 1952: RYJKOV et LOIDINA, 1954). Nous avons d'ailleurs vérifié qu'aucune contamination ne s'était produite : les disques sains, traités comme les virosés, ne donnant aucun culot de centrifugation.

Les disques sont laissés à la lumière durant sept jours, les techniques de titrage sont celles utilisées habituellement, mais seul l'N.P. et le virus ont été évalués. Le tableau VIII résume les résultats d'une expérience, où les milieux de survie étaient du Knop au demi et de l'eau distillée.

On voit que la teneur en N.P. des traités est plus élevée que celle des témoins et que les différences correspondent à la quantité de V.M.T. synthétisée par les disques inoculés. Il y a même un excès non négligeable de « protéines normales » qui doit être en rapport avec celui des protéines non virales signalé par COMMONER. Il faut remarquer cependant que les différences trouvées ne sont pas significatives.

Ainsi, dans les conditions expérimentales décrites, le V.M.T. apparaît, au moins dans sa fraction protéique, comme provenant d'un métabolisme surajouté à celui des protéines normales. Il convient toutefois de remarquer qu'il s'agit d'une expérience portant sur la multiplication du V.M.T. dans sa phase exponentielle : il ne saurait être question d'extrapoler systématiquement ce résultat à des plantes entières, chez lesquelles les modalités de la multiplication du V.M.T. peuvent être profondément altérées par la diversité des conditions physiologiques.

B. Le V.M.T. et les A.R.N. cellulaires

Le schéma expérimental utilisé est le même que celui employé pour l'étude du métabolisme protéique. Le tableau VIII *bis* résume les résultats obtenus.

Tableau VIII

Relation entre la multiplication du virus et le métabolisme protéique de l'hôte

	N.P. pour 1 disque (en mg)	N.S. pour 1 disque (en mg)	P. totales 1 disque (en mg)	V.M.T. 1 disque (en mg)	Protéines norm. (*) (en mg)	Différence P.N. traités — P.N. témoins
Expérience n° 1 (survie des disques dans l'eau distillée)						
Témoins	0,46	0,12	2,797	0	2,797	
Traités	0,60	0,10	3,667	0,226	3,442	+ 0,645
Expérience n° 2 (survie des disques dans du Knop au demi)						
Témoins	0,58	0,33	3,820	0	3,820	
Traités	0,82	0,33	5,030	0,97	4,058	+ 0,238

(*) Les « protéines normales » (P.N.) représentent la différence entre les protéines totales et le V.M.T.

Tableau VIII *bis*

Relation entre la multiplication du V.M.T. et le métabolisme des acides nucléiques de l'hôte

	A.D.N. (en µg pour 1 disque)	A.R.N. totaux (en µg pour 1 disque)	A.R.N. du virus (en µg pour 1 disque)	A.R.N. normaux (*) (en µg)	Différence A.R.N. témoins — A.R.N. traités
Expérience n° 1 (survie des disques dans l'eau distillée)					
Témoins (moyenne de 8 mesures).....	55	155	0	155	+ 23
Traités (moyenne de 8 mesures).....	65	145	13	132	
Expérience n° 2 (survie des disques dans du Knop au demi)					
Témoins (moyenne de 8 mesures).....	64	210	0	210	+ 34
Traités (moyenne de 8 mesures).....	61	193	32	176	

(*) Les A.R.N. normaux représentent la différence entre les A.R.N. totaux et l'A.R.N. du virus.

Les A.D.N. semblent affectés par l'infection virale : cela résulte de l'étude de la variance des écarts entre traités et témoins : cependant globalement, dans le Knop au demi, ils ne subissent qu'une faible variation en faveur des traités : le même phénomène se retrouve accentué, dans l'eau distillée.

Pour les A.R.N. totaux dans l'eau distillée et dans le Knop au demi, il n'y a pas de différences significatives entre traités et témoins mais le léger écart observé est toujours en faveur des témoins.

Ce fait a été retrouvé régulièrement au cours d'autres mesures. Par contre, les A.R.N. normaux des disques virosés sont significativement inférieurs à ceux des témoins.

Dans une expérience déjà citée (tableau XXIV) nous avons titré les acides nucléiques, l'N.P. et le V.M.T. des disques prélevés sur des feuilles de plantes virosées depuis trois mois. Les chiffres obtenus montrent que, dans ce cas, l'A.R.N. du V.M.T. représente un pourcentage élevé des A.R.N. totaux. Par ailleurs, les rapports suivants ont été obtenus :

— Dans des disques non virosés :

$$\frac{\text{A.R.N. totaux}}{\text{N.P. total}} = 205\ \mu g\ \text{d'A.R.N. par mg d'N.P.}$$

$$\frac{\text{A.R.N. normaux}}{\text{N.P. normal}} = 141\ \text{Mg d'A.R.N. par mg d'N.P.}$$

— Dans des disques non virosés :

$$\frac{\text{A.R.N.}}{\text{N.P.}} = 338\ \mu g\ \text{d'A.R.N. par mg d'N.P.}$$

Le fait que le rapport A.R.N. N.P. soit plus faible dans le cas des disques virosés que dans celui des disques sains indique aussi qu'il n'y a pas extra-synthèse d'A.R.N. En effet, si l'A.R.N. du virus était synthétisé en plus des A.R.N. normaux, la valeur du rapport ne devrait pas changer, les protéines virales étant synthétisées supplémentairement.

En conclusion :

1° Dans le cas des disques virosés, il n'y a pas de synthèse d'A.R.N. se superposant à celles des A.R.N. normaux et il est logique de penser que les matériaux servant à la synthèse de l'A.R.N. du virus sont prélevés sur les A.R.N. totaux, ou plutôt sur le pool des nucléotides cellulaires. Ces faits ne soulèvent guère de difficultés biochimiques, les A.R.N. étant soumis aux phénomènes de renouvellement : mais le mécanisme intime du phénomène nous échappe. Quoi qu'il en soit, l'A.R.N. du virus vient en diminution des A.R.N. totaux.

2° Le pourcentage d'A.R.N. viral par rapport aux A.R.N. totaux varie beaucoup. Quand le V.M.T. se multiplie dans des disques en survie ce rapport reste assez bas, par contre dans les Tabacs virosés depuis longtemps il est très élevé. Avec le temps, il s'installe donc une véritable spoliation en A.R.N. Ce fait peut être responsable du développement insuffisant des plantes virosées, de l'appauvrissement en chlorophylle, etc., mais le nanisme des plantes infectées a été attribué à bien des facteurs : c'est ainsi que Best (1936) pense que la scopolétine en est responsable, que Pavillard (1954) l'attribue à une hypoauxinie, d'autres auteurs à une insuffisance de la photosynthèse, à une activité enzymatique excessive, etc. Il n'est pas exclu que la spoliation des plantes en A.R.N. joue également un rôle.

C. Le V.M.T. et sa participation au métabolisme cellulaire

Le comportement des particules de V.M.T. vis-à-vis de l'activité de la cellule hôte nous a paru intéressant à considérer. Meneghini et Delwiche (1951) ont montré que l'N 15 incorporé dans le V.M.T. n'était pas libéré de celui-ci, ce qui implique la stabilité de la particule virulente. Par contre, Zech et Vogt Köhne (1955, 1956), étudiant les variations d'absorption dans l'U.V. de cellules virosées au cours de la multiplication du V.M.T., pensent qu'il existe, pour le virus comme pour les protéines normales, un équilibre (après la phase initiale de multiplication) entre la lyse et la synthèse. Cependant, aucun travail n'a réellement été réalisé directement sur ce sujet.

Résultats expérimentaux.

Des disques prélevés sur des feuilles aussi semblables que possible de Tabacs virosés depuis trois mois ont été disposés dans l'eau distillée à l'obscurité, afin de suivre les variations de leur teneur en virus au cours de la survie.

Tableau IX

Évolution de la teneur en V.M.T. de disques de feuilles prélevées sur des Tabacs virosés depuis trois mois et disposés en survie à l'obscurité dans de l'eau distillée

TEMPS DE SURVIE des disques	TENEUR EN V.M.T. des disques de feuilles (en µg pour 1 disque)
0	1 730
65 h	1 560
82 h	1 600
110 h	2 020
134 h	1 550
168 h	1 730

Le tableau IX montre qu'aucune différence significative n'a été mise en évidence dans la teneur des disques en V.M.T. au cours de la survie : le virus apparaissant ainsi parfaitement stable, tout au moins en ce qui concerne sa fraction protéique. Ceci n'est pas absolument en contradiction avec le point de vue de Zech et Vogt Köhne (1956) selon lequel le V.M.T. subirait une dégradation dans les cellules âgées. En effet, cette dégradation porterait essentiellement sur la séparation des deux fractions nucléique et protéique et, par conséquent, sur le pouvoir infectieux de la particule; mais la fraction protéique inactive subsisterait et se trouverait ainsi titrée comme le V.M.T. normal.

En résumé, dans cette partie de notre travail nous avons mis en évidence :

1° Que la fraction protéique du virus était synthétisée en supplément des protéines normales dans les disques de feuilles, les matériaux pouvant provenir des produits de la lyse protéique consécutive à la mise en survie, ou de l'apport azoté éventuellement présent dans le milieu.

2° Que la fraction A.R.N. du V.M.T. est prélevée en majeure partie sur les A.R.N. normaux de la cellule, ce qui implique une spoliation en A.R.N. des plantes infectées par rapport aux plantes saines.

3° Que la fraction protéique du V.M.T. semble stable et ne peut plus entrer dans le pool cellulaire des peptides et amino-acides.

III. Accélérateurs de croissance et multiplication du V.M.T.

L'existence d'un antagonisme entre la synthèse de certains constituants biochimiques des cellules en voie de prolifération, et la multiplication du V.M.T. nous a incité à étudier l'action de certaines substances favorisant la croissance. Les tissus de Tabac que nous utilisons n'étant pas sensibles à l'action excitatrice de l'A.I.A. ou de l'A.N.A., nous avons utilisé le lait de coco.

A. Action du lait de coco sur la multiplication du V.M.T. en culture de tissus

L'action du lait de coco sur la multiplication du V.M.T. semble avoir été abordée indépendamment et avec des préoccupations très différentes des nôtres par Gendron (1950) et Segretain (1952). Gendron a étudié l'influence de pulvérisations de lait de coco sur des feuilles de tabac avant ou après leur infection avec du V.M.T. Il trouve dans ces conditions une inhibition sensible de la multiplication du virus. Par contre, Segretain a montré qu'en culture de tissus

de Crown-Gall et en absence d'A.I.A., le lait de coco favorise la multiplication du V.M.T. Par contre, en présence d'A.I.A. à 10^{-7} et après deux mois de culture, le lait de coco est sans action directe sur le développement du virus. Mais l'auteur signale la présence de bourgeon feuillé dans le cas où ses cultures sont effectuées sur un milieu dépourvu d'hétérauxine; la souche utilisée n'est donc pas stable et il n'est pas possible dans ces conditions d'affirmer que les résultats obtenus sont dus à une action directe sur le virus, ce dernier pouvant se multiplier activement dans les formations foliaires signalées. De toute façon, il importait de reprendre ce problème, de compléter et d'approfondir les résultats précédents.

Schéma expérimental et résultats.

Nous avons réalisé deux types d'expériences :

Premier type :

Deux sortes de tissus de Tabac ont été utilisés : la souche de tissus accoutumés et la souche de Crown-Gall.

Les tissus accoutumés poussant normalement bien, il est nécessaire d'ajouter au milieu de base une concentration en lait de coco égale à 10 % pour introduire une différence de croissance valable entre traités et témoins. Par contre, dans le cas du Crown-Gall, 5 % de lait de coco suffisent. Les témoins sont constitués par des colonies poussant sur milieu de base normal. Les techniques de culture sont celles décrites dans la première partie. Au cours de cette expérience, seul le virus a été titré. Le tableau X résume les résultats obtenus.

On voit que le lait de coco accélère et prolonge la croissance des tissus accoutumés et de Crown-Gall; l'accroissement du poids frais est faible pour les témoins au cours du troisième mois, il reste élevé pour les traités. Il faut d'ailleurs remarquer que le Crown-Gall est encore sensible à l'action du lait de coco au cours du troisième mois, par contre le tissu accoutumé l'est peu. La teneur en virus, ramenée au gramme de substance fraîche, est faible après deux mois de culture et identique pour les témoins et les traités. Elle augmente pour tous les tissus au cours du troisième mois, mais des différences significatives apparaissent alors dans le cas du Crown-Gall entre témoins et traités; ceci est en accord avec ce que nous avons déjà exposé : les témoins, pour ce dernier tissu, sont déjà dans la phase d'accroissement et le virus se multiplie alors activement. Par ailleurs, il peut paraître paradoxal que pendant les deux premiers mois de la croissance, alors que l'intensité de celle-ci est nettement différente entre traités et témoins, la teneur en virus soit pratiquement la même pour toutes les colonies, ou tout au moins ne présente que des différences faibles.

Les résultats obtenus, en particulier avec le Crown-Gall montrent que la multiplication du virus est en relation avec l'état physiologique des cellules. Pendant la phase de multiplication cellulaire il doit

s'établir un rapport entre le pouvoir de synthèse des cellules en virus et leurs besoins propres : tant que les phénomènes de division cellulaire l'emportent sur ceux d'accroissement, la multiplication du virus reste faible; si la colonie croît très vite, la teneur en virus en valeur absolue grandira, mais la teneur par unité de poids frais ou d'N.P. restera approximativement la même. Dès que la phase de multipli-

TABLEAU X

Influence du lait de coco sur la multiplication du V.M.T. en cultures de tissus de tabac

Conditions expérimentales	Accroissement du poids frais au cours des 2 premiers mois de culture (en g)	V.M.T. en µg par gramme de poids frais après 2 mois de culture	Accroissement du poids frais au cours du troisième mois de culture (en g)	V.M.T. en µg par gramme de poids frais après 3 mois de culture
Crown-Gall :				
Sur Knop au demi + 35 g de saccharose + 5 % de lait de coco	2,5	200	0,620	450
Sur Knop au demi + 35 g de saccharose	1,450	196	0,150	650
Tissus accoutumés :				
Sur Knop au demi + 35 g de saccharose + 10 % de lait de coco	3,030	114	0,720	211
Sur Knop au demi + 35 g de saccharose	2,080	92	0,570	197

cation est terminée, les rapports entre le pouvoir de synthèse de la cellule en V.M.T. et en constituants normaux sont inversés. Ce point de vue méritait d'être approfondi et vérifié, en particulier sur les tissus accoutumés; c'est le sens de la seconde série d'expériences entreprises.

Deuxième type :

Un lot de tissus de Tabac accoutumés âgé de quatre-vingt-cinq jours est repiqué dans les conditions habituelles sur un milieu de base classique additionné de 10, 20 ou 30 % de L.C. Dans cette expérience, les colonies repiquées sur 10 % de L.C. représentent le témoin. La croissance, les constituants biochimiques et le virus ont été évalués. Les courbes 24, 25, 26, 27, 28 et 29 résument les résultats obtenus.

On voit :

1° Que la croissance pondérale est d'autant plus rapide que la concentration en lait de coco est plus grande, cependant les différences s'amenuisent après soixante-six jours de culture et, en fin de croissance, les différences ne sont plus significatives.

2° Que la teneur en N.P. des trois types de tissus présente au

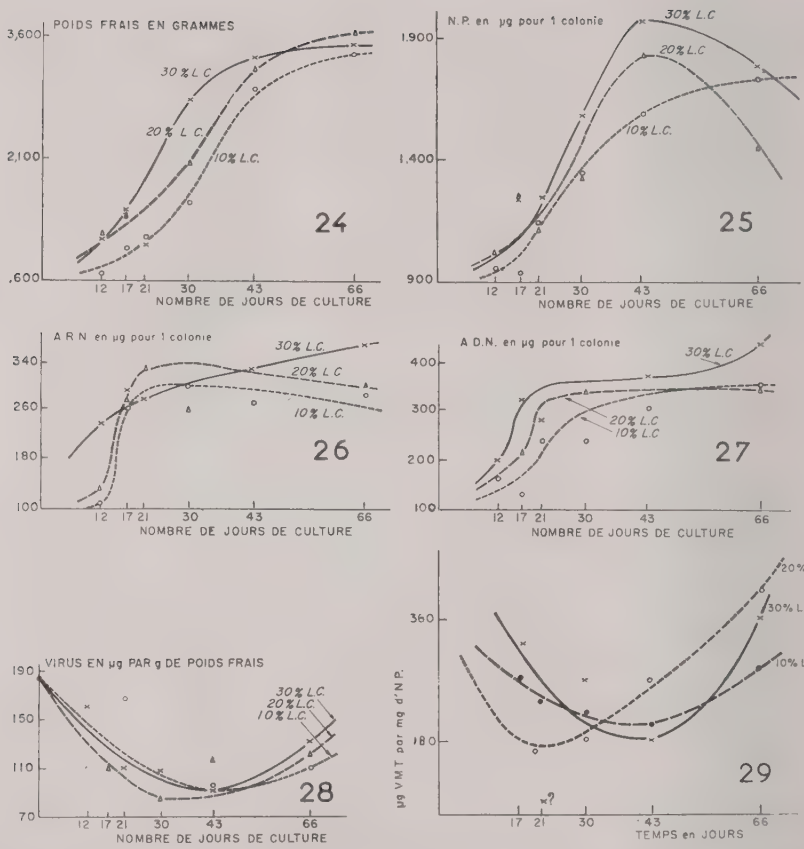


Fig. 24 : Croissance de tissus accoutumés de Tabac sur un milieu à base de Knop au demi + 35 g de saccharose additionné de diverses concentrations de lait de coco.

Fig. 25 : Évolution de la teneur en N.P. de tissus accoutumés de Tabac croissant sur milieu à base de Knop au demi + 35 g de saccharose et additionné de diverses concentrations de lait de coco.

Fig. 26 : Évolution de la teneur en A.R.N. de tissus accoutumés de Tabac croissant sur milieu à base de Knop au demi + 35 g de saccharose et additionné de diverses concentrations de lait de coco.

Fig. 27 : Évolution de la teneur en A.D.N. de tissus accoutumés de Tabac croissant sur milieu à base de Knop au demi + 35 g de saccharose et additionné de diverses concentrations de lait de coco.

Fig. 28 : Évolution de la teneur en V.M.T. exprimée en fonction du poids frais de tissus accoutumés de Tabac croissant sur milieu à base de Knop au demi + 35 g de saccharose et additionné de diverses concentrations de lait de coco.

Fig. 29 : Évolution de la teneur en V.M.T. exprimée en fonction de l'N.P. de tissus accoutumés de Tabac croissant sur milieu à base de Knop au demi + 35 g de saccharose et additionné de diverses concentrations de lait de coco.

quarante-cinquième jour de culture des différences plus grandes que l'évaluation du poids frais ne pouvait le faire supposer et rend mieux compte, par conséquent, de l'importance de la phase de multiplication dans chaque tissu. La protéolyse est ensuite importante pour les cultures poussant sur 20 et 30 % de lait de coco, alors qu'elle n'est pas encore commencée pour ceux poussant sur 10 %. Les phases de la croissance sont donc décalées les unes par rapport aux autres, comme le montrait déjà le poids frais.

3° L'étude des acides nucléiques montre qu'au niveau des A.R.N. les différences sont moins fortes pour les cultures poussant sur 10 et 20 % de lait de coco qu'elles ne l'étaient pour l'N.P. Le comportement des cultures poussant sur 30 % de lait de coco est assez aberrant. La lyse des A.R.N. ou tout au moins leur stabilisation commence plus tôt que celle de l'N.P. et elle est moins intense.

En ce qui concerne les A.D.N., des différences importantes et significatives se manifestent surtout au départ entre les colonies poussant sur diverses concentrations en lait de coco. Le lait de coco semble exalter la synthèse des A.D.N.

4° L'évolution de la teneur en virus, exprimée en fonction du poids frais, confirme ce qui a déjà été vu à propos de la multiplication du V.M.T. dans les cultures de tissus. Le parallélisme des courbes obtenues est remarquable et il est intéressant de constater que les valeurs sont très voisines, sinon identiques, après six semaines de culture. En fin de croissance, les teneurs en V.M.T. des trois types de colonies présentent des différences faibles et non significatives, qui permettent de penser que pratiquement la teneur en V.M.T. est la même par unité de poids frais : le lait de coco n'a pas, en culture de tissus, une influence directe sur la multiplication du V.M.T.

5° Il ressort de tout ceci que pendant la phase de multiplication, il semble s'établir dans les cellules en voie de division une relation entre le virus et les éléments biochimiques cellulaires. Cette relation se modifie quand la cellule est devenue adulte. La multiplication du virus s'accélère alors.

Ce point de vue est confirmé par l'étude du rapport virus/ N.P. qui montre :

- Que le taux minimum de V.M.T. coïncide avec la période de la croissance, pendant laquelle l'N.P. est plus abondant;

  Que la courbe remonte rapidement après le quarante-cinquième jour, pour les cultures poussant sur 20 et 30 % de lait de coco; la remontée est moins rapide pour les colonies maintenues sur 10 % : dans ce cas, la phase d'accroissement débute plus tard;

- Que le rapport virus/N.P. présente des valeurs assez voisines pour les divers types de cultures, particulièrement au minimum, c'est-à-dire quand les différences en N.P. sont précisément les plus fortes;

ceci implique bien la mise en jeu de rapports particuliers entre le virus et les éléments biochimiques de la cellule, quand celle-ci est en voie de division. De l'étude du rapport virus/A.R.N., on tirerait des conclusions analogues.

6° Enfin, en culture de tissus, le lait de coco est sans influence sur la multiplication du V.M.T.; ce résultat est en contradiction avec ceux obtenus par Gendron (1950) et par Mlle Lucardie (1951) sur le lait de divers palmiers, mais ces auteurs ne travaillaient pas dans les mêmes conditions. Il importait donc de vérifier si le lait de coco avait une action sur la multiplication du V.M.T. quand celui-ci se multipliait dans des disques de feuilles.

B. Influence du lait de coco sur la multiplication du V.M.T. dans des disques de feuilles en survie

Dans une première série d'expériences, nous avons utilisé deux sortes de milieux de base, l'un est exclusivement constitué par de l'eau, l'autre par du Knop au demi. A chacun de ces milieux est ajouté pour les traités du lait de coco, de manière à obtenir des concentrations finales de 5, 10 et 15 %, le Knop témoin n'a pas été dilué par adjonction d'une quantité correspondante d'eau. Le lait de coco contient en effet les sels minéraux et nous avons estimé qu'en laissant au témoin sa concentration initiale en sels, les différences devaient être plus minimes. Les milieux sont ajustés à pH 5,0. On a procédé à une stérilisation préalable des disques de feuilles comme il a été dit (1re partie, chapitre IV), ou bien on a ajouté aux milieux de survie de la sulfadiazine et de la nystatine; dans les deux cas les résultats ont été identiques : le tableau XI les résume.

Tableau XI

Action du lait de coco sur la multiplication du V.M.T. en disques de feuilles en survie pendant sept jours à la lumière dans des milieux non glucosés

Composition des milieux de base	Teneur en virus (µg pour 2 disques) Traités 5 % L.C.	Témoins	Traités 10 % L.C.	Témoins	Traités 15 % L.C.	Témoins
Eau	1 455	1 340	1 326	1 240	1 340	1 190
Différence entre les traités et les témoins	+ 8 %		+ 15 %		+ 13 %	
Knop au demi	1 135	1 220	1 610	1 120	1 390	995
Différence entre les traités et les témoins		+ 7 %	+ 44 %		+ 40 %	

On voit que :

1° Dans l'eau distillée, le lait de coco favorise la multiplication du V.M.T. La concentration de 10 % paraît être la plus favorable. Les différences obtenues sont significatives pour 10 et 15 %.

2° En présence de sels minéraux aux concentrations de 10 et 15 %, le lait de coco provoque une exaltation très sensible de la multiplication du virus : la présence de sels minéraux renforce donc considérablement l'action du lait de coco.

On peut penser alors que le lait de coco intervient par les substances carbonées qu'il contient, notamment par l'apport en glucides qu'il confère au milieu. Aussi, avons-nous entrepris une seconde série d'expériences, dans laquelle le milieu de base contenait du glucose. Le tableau XII résume les résultats obtenus.

On voit que :

— Que le lait de coco n'exerce pas d'action sur la multiplication du virus à la lumière si le milieu est dépourvu de sels minéraux : par contre, à l'obscurité, une inhibition importante se manifeste pour la concentration de 10 %.

Qu'en présence d'ions minéraux, l'inhibition apparaît nettement aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité.

TABLEAU XII

Influence du lait de coco sur la multiplication du V.M.T. dans des disques de feuilles en survie dans des milieux contenant 20 g de glucose par litre pendant sept jours

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES	TENEUR EN VIRUS en µg pour 1 disque — Milieu de base : Eau — Traités	Témoins	Milieu de base : Knop au demi — Traités	Témoins
Concentration en lait de coco 10 % :				
A la lumière	890	875	715	1 125
Traité/Témoin	+ 2 %	...	...	+ 36,5 %
A l'obscurité	392	700	510	748
Traité/Témoin	...	+ 44 %	...	+ 32 %
Concentration en lait de coco 15 % :				
A la lumière	875	855	750	1 125
Traité/Témoin	+ 2 %	...	...	+ 33,5 %
A l'obscurité	413	513	650	760
Traité/Témoin	...	+ 18 %	...	+ 14,5 %

Une troisième série d'expériences a été entreprise afin de voir quelle pouvait être l'action du lait de coco sur les éléments biochimiques de disques de feuilles non virosées. Le dispositif habituel a

été adopté et nous avons déposé les disques traités dans un milieu de survie constitué par du Knop au demi additionné de 20 g de glucose par litre et auquel on a ajouté 10 % de L.C., les témoins sont mis en survie dans le même milieu mais dépourvu de L.C. Après sept jours de survie à l'obscurité, les constituants biochimiques sont titrés. Le tableau XIII résume les résultats.

Tableau XIII

Influence du lait de coco sur l'évolution des constituants biochimiques de disques de feuilles de Tabac en survie dans du Knop au demi + 20 g de glucose pendant sept jours à l'obscurité

	Azote pour 1 disque protéique (en mg)	Azote pour 1 disque soluble (en mg)	A.D.N. pour 1 disque (en µg)	A.R.N. pour 1 disque (en µg)
Traités (moyenne de 7 mesures).	0,64	0,12	132	214
Témoins (moyenne de 7 mesures)	0,62	0,13	73	185
Traités/Témoins	+ 3 %	— 8 %	+ 82 %	+ 16 %

On voit immédiatement :

— Que le lait de coco est sans action notable sur l'azote protéique et l'azote soluble.

- Que les disques traités contiennent beaucoup plus d'A.D.N. que les disques témoins; nous retrouvons, accentué, le phénomène déjà décrit de la synthèse d'A.D.N. sans que les divisions cellulaires puissent en être rendues responsables.

- Que les A.R.N. sont plus abondants dans les traités que dans les témoins, mais l'action du L.C., bien que significative, reste faible et sans rapport avec celle exercée sur les A.D.N.

En conclusion : les expériences réalisées ont permis de mettre en évidence :

1° Que le lait de coco favorise la croissance des cultures de tissu en exerçant son action à la fois sur la phase de multiplication (accentuation de la synthèse des A.D.N. et de l'N.P.) et sur la phase d'accroissement. On peut penser aussi que l'action du L.C. s'exerce spécifiquement sur les A.D.N., et que l'enrichissement en N.P. des cultures de tissus poussant sur L.C. n'est pas le résultat d'une influence directe de celui-ci, mais la conséquence d'une action stimulante sur la synthèse des A.D.N.

La méthode comparative employée nous a ainsi permis de comprendre le mode d'action du L.C.

2° Que les rapports virus-cellule se modifient au cours de la culture des tissus, cette modification pouvant être plus ou moins rapide suivant le rythme de la croissance. Il est possible qu'en fin de culture les rapports virus-cellules dans les colonies soient voisins de ceux existant dans les disques de feuilles.

3° Que le L.C. n'a aucune action directe sur la multiplication du V.M.T. en culture de tissus. Ce point de vue déjà exprimé en 1956 (Hirth et Segretain) a été confirmé par Kassanis (1957).

4° Que le L.C. exerce une action inhibitrice sur la multiplication du V.M.T. en disques de feuilles, mais seulement dans des conditions très particulières ne permettant pas de dire que les résultats de Gendron (1950) aient été retrouvés. On peut se demander si cette action inhibitrice n'est pas la conséquence de l'exaltation de la synthèse des A.D.N. : les matériaux nécessaires à la synthèse des A.R.N. du V.M.T. étant détournés au profit de la formation des A.D.N.

C. Action de l'A.I.A. sur la multiplication du V.M.T. en cultures de tissus et en disques de feuilles

Christiansen et Thimann (1950) ont remarqué que l'A.I.A. provoquait une exaltation de la synthèse des protéines dans les fragments de tige de Pois en survie; dans ce cas, il n'y a pas de divisions cellulaires, cependant ils n'ont pu, par la suite, confirmer ces résultats. Dans les coléoptiles d'Avoine, ils ont même observé une légère inhibition de la protéogénèse sous l'influence de l'A.I.A.

De toute façon, l'A.I.A. semble pouvoir intervenir au niveau du métabolisme des protéines: aussi, Porter (1953), Silberger et Skoog (1953) (cités dans Skoog, 1955) avec des racines de Blé ou avec des fragments de moelle de Tabac montrèrent que l'A.I.A. avait une influence sur le métabolisme des acides nucléiques. Dans l'ensemble, les travaux réalisés sur l'A.I.A. ou des substances voisines sont, sur ce sujet, peu nombreux. Par ailleurs, Gautheret et White en particulier ont montré l'influence de l'A.I.A. et de substances analogues sur la croissance des tissus végétaux.

Les cultures de tissus de Tabac accoutumés ou de Crown-Gall ne sont pas sensibles aux doses biologiquement actives d'auxines, sans doute, comme l'a montré Gautheret (1955) au cours d'études qu'il a poursuivies sur le phénomène d'anergie, parce qu'ils secrètent eux-mêmes les doses d'auxines nécessaires à leur croissance. D'autre part, on sait grâce aux travaux de Gautheret (cf. Revue générale, 1955) que l'A.I.A. à fortes doses inhibe la croissance et provoque des modifications cellulaires importantes. Ainsi, l'A.I.A. peut intervenir au niveau des éléments biochimiques cellulaires qui nous intéressent. D'autre part, Kutsky et Rawlins (1950) ont mis en évidence une action de l'A.I.A. sur la teneur en virus des colonies se formant à

l'extrémité de fragments de tiges de Tabac en survie dans un milieu nutritif. Dans ces conditions, l'utilisation de l'A.I.A. à diverses concentrations pouvait permettre de préciser le mécanisme de la multiplication du V.M.T. tant en cultures de tissus qu'en disques de feuilles.

1° Action de l'A.I.A. sur le métabolisme de l'N.P., des A.R.N. et sur la multiplication du V.M.T. des cultures de tissus.

Il n'existe pas de différences significatives dans le comportement des colonies de tissus de Tabac sains et virosés, c'est pourquoi il nous a paru inutile d'exposer les résultats préliminaires obtenus sur des colonies non virosées.

Des cultures de tissus accoutumés de Tabac virosés sont repiquées dans les conditions habituelles sur un milieu de base contenant des concentrations variées d'A.I.A.; les témoins sont constitués par des colonies poussant sur un milieu de base dépourvu d'A.I.A. La croissance a été évaluée ainsi que les constituants biochimiques et le V.M.T.

Les courbes 30, 31, 32 résument les résultats obtenus à propos de la croissance, l'N.P. et l'N.S. après vingt jours et trente-deux jours de culture. Nous n'avons pas, en effet, fait nos mesures au-delà de trente-deux jours : l'aspect et le comportement des cultures poussant sur de fortes concentrations d'A.I.A. indiquant que la survie des colonies était très compromise.

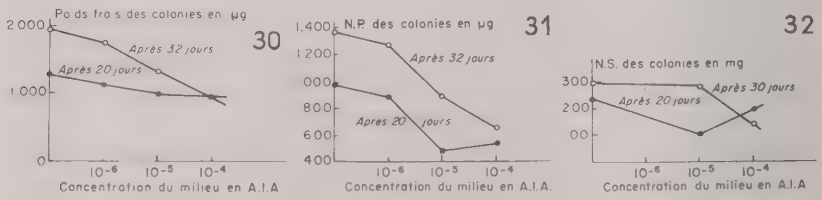


Fig. 30 : Influence de l'A.I.A. sur la croissance de colonies de tissus accoutumés de Tabac cultivés sur Knop au demi + 35 g de saccharose.

Fig. 31 : Influence de l'A.I.A. sur la teneur en N.P. de tissus accoutumés de Tabac cultivés sur Knop au demi + 35 g de saccharose.

Fig. 32 : Influence de l'A.I.A. sur la teneur en N.S. de tissus accoutumés de Tabac cultivés sur Knop au demi + 35 g de saccharose.

Action sur la croissance exprimée en poids frais.

Une inhibition nette et significative apparaît dès le vingtième jour pour les fortes concentrations en A.I.A. (10^{-5} et 10^{-4}). Après trente jours de culture, cette inhibition s'accentue et des différences significatives apparaissent alors entre les concentrations de 10^{-5} et 10^{-4}.

Action sur l'N.P. et l'N.S.

L'étude comparative des pourcentages d'inhibition de l'N.P. et du poids frais par l'A.I.A. après vingt et trente-deux jours de culture montre qu'au début ce dernier affecte davantage la synthèse protéique, donc la phase de multiplication, que l'accroissement du poids frais; mais entre le vingtième et le trente-deuxième jour, l'action de l'A.I.A. se manifeste avec une égale intensité sur les deux phases.

L'azote soluble accuse une diminution nette, surtout après trente-deux jours de culture : l'A.I.A. à forte concentration inhibe dans son ensemble la synthèse protéique, alors que dans nos conditions il est sans influence aux concentrations biologiques.

Ces résultats infirment ceux de Christiansen et Thimann (1950). Il est vrai que nos conditions expérimentales sont différentes et que, comme nous l'avons dit, les auteurs américains n'ont pu répéter leurs expériences.

Action sur les acides nucléiques.

Le tableau XV résume les résultats obtenus.

1° *Pour les A.R.N.*, il n'y a pas de différences significatives entre les A.R.N. des cultures poussant sur 10^{-6} d'A.I.A. et les témoins. Par contre, aux concentrations d'A.I.A. de 10^{-5} et 10^{-4}, l'inhibition est significative et identique pour les deux concentrations, ce qui est en accord avec ce qui a été vu à propos de l'N.P. Après trente-deux jours, on constate une diminution générale des A.R.N. On remarque aussi que l'action de l'A.I.A. sur les A.R.N. s'exerce très tôt : le taux d'inhibition étant le même à vingt jours et à trente-deux jours de culture. Cette observation, rapprochée de ce qui a été vu

Tableau XV

Influence de l'A.I.A. sur les A.R.N. et A.D.N. de cultures de tissus accoutumés de Tabac virosés croissant sur Knop au demi + 35 g de saccharose

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES	µg A.R.N. par colonie	Inhibition des A.R.N. pour 1 colonie par rapport aux témoins	µg A.D.N. par colonie	Inhibition des A.D.N. pour 1 colonie par rapport aux témoins	Rapport $\frac{\text{A.R.N.}}{\text{A.D.N. (en µg)}}$	Rapport $\frac{\text{µg A.R.N.}}{\text{mg N.P.}}$	Rapport $\frac{\text{µg A.D.N.}}{\text{mg N.P.}}$
Après 20 jours :							
Sans A.I.A...	234		302		0,775	239	308
A.I.A. 10^{-5}...	145	38 %	220	27 %	0,660	299	455
A.I.A. 10^{-4}...	140	40 %	176	42 %	0,795	272	342
Après 32 jours :							
Sans A.I.A...	166		368		0,450	122	268
A.I.A. 10^{-5}...	126	24 %	272	26 %	0,464	141	306
A.I.A. 10^{-4}...	96	42 %	146	60 %	0,656	148	223

pour l'N.P., tend à montrer que l'action de l'A.I.A. s'exerce plus rapidement sur les A.R.N. que sur les protéines. Ceci est confirmé par l'étude des rapports A.R.N./N.P.

2° *Sur les A.D.N.*, l'A.I.A. exerce après vingt jours de culture une action analogue à celle observée sur les A.R.N. Cette action s'accentue entre le vingtième et le trente-deuxième jour pour la concentration de 10^{-4}, elle est liée sans doute à l'inhibition de la multiplication des cellules, cette inhibition entraînant une chute du taux des A.R.N. et de celui de l'N.P. Cependant, la diminution de ce dernier est proportionnellement plus élevée que celle des A.R.N. L'A.I.A. possède donc sans doute une action lytique sur les protéines. Ce point de vue est confirmé par l'étude du rapport A.R.N./A.D.N.

En résumé, l'A.I.A., à forte concentration en culture de tissus accoutumés de Tabac, agit sur les A.D.N. en inhibant leur synthèse et sur les protéines en favorisant leur lyse.

Action sur la multiplication du V.M.T.

Le tableau XVI résume les résultats obtenus. On voit :

— Que seule la concentration de 10^{-5} semble exercer une inhibition spécifique sur la multiplication du V.M.T. exprimée sur une base de poids frais;

— Que si on ramène le virus à l'N.P. on ne trouve aucune différence significative dans la teneur en V.M.T. des différentes séries, sauf pour la concentration de 10^{-4}.

Tableau XVI

Influence de l'A.I.A. sur la multiplication du V.M.T. en culture de tissus accoutumés de Tabac sur Knop au demi + 35 g de saccharose

CONDITIONS DE CULTURE	Virus / Poids frais	Virus / N.P.	Virus / A.R.N.
Après 20 jours :			
Sans A.I.A.	137	191	0,80
A.I.A. 10^{-6}	150	162	0,83
A.I.A. 10^{-5}	84	183	0,61
A.I.A. 10^{-4}	123	224	0,88
Après 32 jours :			
Sans A.I.A.	115	177	1,12
A.I.A. 10^{-6}	120	159	0,96
A.I.A. 10^{-5}	78	142	0,99
A.I.A. 10^{-4}	110	284	1,21

Les résultats précédents appellent les remarques suivantes :

Si l'on considère la teneur en V.M.T. ramenée à l'N.P., l'A.I.A. n'exerce aucune action inhibitrice spécifique sur le virus; la dimi-

nution en valeur absolue du virus dans les cultures traitées semble être la conséquence de l'action inhibitrice de l'A.I.A. sur la protéogénèse. Ceci conduit à penser que les mécanismes de la synthèse protéique normale et ceux de la synthèse du V.M.T. sont identiques ou du moins très voisins.

Les colonies poussant sur 10^{-4} d'A.I.A. ont, sur une base d'N.P., une teneur accrue en V.M.T. Ce fait peut sembler paradoxal, mais s'explique à la lumière des considérations exposées précédemment. Non seulement les colonies ont peu poussé sur 10^{-4}, mais leur teneur en N.P. a diminué; or, le virus représentant un élément stable qui ne subit point de phénomène lytique et reste identique à ce qu'il était au départ : le rapport virus N.P. va donc augmenter. Ce fait est confirmé par une autre observation : des cultures conservées pendant plus de huit mois, et présentant des nécroses importantes, contiennent, par gramme de poids frais, des quantités de V.M.T. voisines de celles observées après trois mois de culture. De l'étude du rapport V.M.T. A.R.N. on tirerait des conclusions analogues.

2° Action de l'A.I.A. sur le comportement de disques de feuilles saines et virosées.

Dans le cas des disques de feuilles, nous avons étudié l'action de l'A.I.A. à la fois sur des disques provenant de feuilles saines et de feuilles virosées.

a) *Influence de l'A.I.A. sur la croissance de disques non virosés.*

Le dispositif habituel est utilisé. Les milieux de survie sont le Knop au demi et l'eau distillée.

Les milieux traités ont une concentration de 10^{-4}, 10^{-5} ou 10^{-6} en A.I.A. A la lumière comme à l'obscurité l'auxine favorise de façon significative la croissance des disques. La lumière accentue la croissance des disques aussi bien chez les témoins que chez les traités. Il est assez difficile d'interpréter avec exactitude le rôle de la lumière. On sait, en effet, qu'elle détruit l'auxine, mais nous n'avons pas trouvé de différences sensibles dans nos résultats lors d'une autre expérience où nous avons changé chaque jour les milieux de survie. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par de Ropp (1948), Miller (1951) et Thimann (cf. Revue générale, 1955) sur des disques de feuilles ou des tranches d'organes de divers végétaux. Il est vraisemblable d'admettre que la croissance des disques est liée à un mouvement de l'eau pénétrant dans les cellules, entraînant éventuellement avec elle les sels minéraux. Cet aspect indirect de l'influence de l'auxine ne devra pas être négligé lorsqu'il s'agira d'interpréter les résultats de son activité sur la multiplication du V.M.T.

b) *Influence de l'A.I.A. sur la teneur en N.P. et en N.S. de disques non virosés.*

Des disques de feuilles prélevés dans les conditions habituelles sont disposés à la lumière dans du Knop au demi additionné d'A.I.A. à des concentrations variant entre 10^{-7} et 10^{-4}. Le tableau XVII consigne les résultats obtenus. Afin de ne pas surcharger inutilement ce tableau nous n'avons pas donné les résultats à 10^{-7} et à 10^{-6}, aucune différence significative n'ayant été observée entre les traités et les témoins.

Tableau XVII

Action de l'A.I.A. sur l'évolution de l'azote protéique de disques de feuilles non virosées en survie à la lumière, dans du Knop au demi

Conditions expérimentales		Concentration en A.I.A. 10^{-5} Témoins	10^{-5} Traités	10^{-4} Témoins	10^{-4} Traités
N.P. et N.S. pour un disque après 7 jours de survie dans du Knop au demi (en µg)	N.P.	826	730	716	650
	différence en %	+ 13 %	...	≠ 10,1	..
	N.S.	511	551	466	570
	différence en %	...	+ 7,8	...	+ 22,3
N.P. et N.S. pour un disque après 10 jours de survie dans du Knop au demi (en µg)	N.P.	502	468	796	770
	différence en %	+ 7,2	...	+ 3,3	...
	N.S.	158	90?	476	440
	différence en %	+ 33,5	...	+ 7,8	...

On voit que les phénomènes de protéolyse sont sensiblement accélérés par la présence de l'A.I.A. Au bout de sept jours, les différences entre traités et témoins sont faibles pour l'N.P., mais significatives. Elles sont plus élevées pour l'N.S. à 10^{-1}: on peut attribuer ce fait à une double action de l'auxine : d'une part elle favorise la protéolyse et, d'autre part, la pénétration des ions NH^4 présents dans le milieu. Ces deux actions apparaissent antagonistes puisque la pénétration des ions NH^4 peut favoriser la protéosynthèse.

Après dix jours de survie, les différences entre traités et témoins ne sont pas significatives, mais l'état des disques est mauvais, surtout pour les traités. Il est donc difficile de prolonger les expériences au-delà de sept jours.

Une expérience effectuée à l'obscurité a donné les résultats suivants exprimés en milligrammes de protéine pour un disque :

Disques en survie dans du Knop
au demi pendant sept jours à l'obscurité :

Traités	3,06
Témoins.....	3,74
Traités/Témoins	— 18 %

Les phénomènes sont donc identiques à la lumière et à l'obscurité. Des résultats très voisins ont été obtenus quand la survie a lieu dans l'eau distillée; pour l'N.S. son pourcentage d'augmentation est en accord avec le pourcentage de protéolyse.

c) *Influence de l'A.I.A. sur la multiplication du V.M.T. dans des disques de feuilles.*

Trois séries d'expériences ont été réalisées.

Dans la première série, l'influence de l'A.I.A. sur la multiplication du V.M.T. a été étudiée. La technique habituelle a été utilisée, les milieux de survie ont été renouvelés chaque jour.

On a alors remarqué que la concentration de 10^{-4} d'A.I.A. donne des différences significatives (12 à 14 %). Les pourcentages d'inhibition obtenus sont identiques à la lumière et à l'obscurité. Les concentrations supérieures à 10^{-4} lèsent rapidement les disques et pour cette raison n'ont pas été utilisées.

Dans une seconde série d'expériences, les liens éventuels existant entre les modifications apportées par l'A.I.A. au métabolisme protéique et celles induites au niveau de la multiplication du V.M.T. ont été recherchés. Ces expériences sont effectuées les unes à la lumière et les autres à l'obscurité.

A la lumière, les concentrations de 10^{-5} et 10^{-4} d'A.I.A. sont employées, les résultats sont donnés en protéines totales : leur titrage ainsi que celui du V.M.T. sont effectués par les procédés habituels.

Sachant que la fraction protéique du V.M.T. est synthétisée en supplément des protéines normales, nous pouvons déterminer ces dernières en retranchant le V.M.T. des protéines totales. On voit alors (tableau XVIII) :

1° Que seule la concentration de 10^{-4} a une action significative tant sur les protéines normales que sur le V.M.T.

2° Que l'action de l'A.I.A. sur les protéines normales est plus intense que celle exercée sur le V.M.T., mais les différences sont faibles; on pourrait penser que l'A.I.A. est à la fois capable d'accélérer la protéolyse et d'inhiber la protéosynthèse liée à la formation du V.M.T.

Dans une troisième série d'expériences réalisées à l'obscurité, à la concentration de 10^{-4} d'A.I.A., les titrages de V.M.T. et de protéines ont été effectués après quatre jours et sept jours de survie.

Tableau XVIII

Influence de l'A.I.A. sur les protéines totales, les protéines normales et le V.M.T. de disques de feuilles virosées, en survie dans du Knop au demi à la lumière, pendant sept jours

	A.I.A. : 10^{-4}		A.I.A. : 10^{-5}	
	Traités	Témoins	Traités	Témoins
Protéines totales (en µg pour 1 disque)	3 125	3 775	4 375	4 575
Traités/Témoins.....	...	+ 17 %	...	+ 4 %
Virus en µg pour 1 disque....	505	567	686	738
Traités/Témoins.....	...	+ 11 %	...	+ 8 %
Quantité de virus par rapport aux protéines totales	16,2 %	15,1 %	15,8 %	16,1 %
Protéines normales (protéines totales - virus) en µg pour 1 disque	2 620	3 207	3 689	3 836
Traités/Témoins.....	...	+ 19 %	...	+ 4,5 %

Le tableau XIX montre que l'inhibition significative exercée par l'A.I.A. sur la multiplication du V.M.T. se retrouve, que cette action est plus forte au début qu'à la fin de l'expérience. C'est le contraire en ce qui concerne les protéines normales : on en déduit que l'A.I.A. manifeste indépendamment son action sur la multiplication du V.M.T. et sur le métabolisme protéique normal.

Tableau XIX

Influence de l'A.I.A. à la concentration de 10^{-4} sur les protéines totales, les protéines normales et le V.M.T. de disques de feuilles isolés en survie dans du Knop au demi à l'obscurité

	Survie : 4 jours		Survie : 7 jours	
	Traités	Témoins	Traités	Témoins
Protéines totales (en µg pour 1 disque)	3 335	3 540	2 976	3 540
Traités/Témoins.....	...	+ 5,5 %	...	+ 16 %
Virus en µg pour 1 disque....	300	362	420	485
Traités/Témoins.....	...	+ 17 %	...	+ 13,5 %
Quantité de virus par rapport aux protéines totales	10 %	10,25 %	14,1 %	13,7 %
Protéines normales (protéines totales - virus) en µg pour 1 disque.....	3 040	3 175	2 556	3 055
Traités/Témoins.....	...	+ 4 %	...	+ 16 %

Cependant, la teneur en protéines des disques en fin de survie se stabilise; stabilisation due, comme on l'a vu, à la reprise des phéno-

mènes de protéosynthèse, non négligeable en fin de survie. Le décalage entre l'action exercée sur le V.M.T. et sur les protéines normales par l'A.I.A. conduit à penser que cette substance inhibe la protéosynthèse; les mécanismes des protéosynthèses normale et virale apparaissent ainsi très voisins.

Dans une autre série d'expériences nous avons titré les constituants biochimiques et le V.M.T. après cinq jours de survie, ce temps pouvant présenter de l'intérêt vu le décalage qui existe entre l'action de l'A.I.A. sur le V.M.T. et sur les protéines normales.

Le tableau XX montre qu'en ce qui concerne les protéines et le V.M.T. les observations précédentes sont, dans l'ensemble, confirmées, une importante inhibition du V.M.T. apparaissant à la lumière.

Tableau XX

Action de l'A.I.A. sur les protéines, le virus et les acides nucléiques de disques de feuilles en survie dans du Knop au demi pendant cinq jours

	LUMIÈRE		OBSCURITÉ	
	Témoins	Traités	Témoins	Traités
Protéines totales en µg pour 1 disque	4 800	4 500	3 340	2 550
Traités/Témoins	+ 7 %		+ 24 %	
Virus en µg pour 1 disque	1 016	735	450	400
Traités/Témoins	+ 27 %		+ 11 %	
Protéines normales en µg pour 1 disque	3 782	3 765	2 890	2 150
Traités/Témoins	+ 1 %		+ 25,5 %	
A.R.N. totaux en µg pour 1 disque	195	140	145	90
Traités/Témoins	+ 28,5 %		+ 38 %	
A.R.N. normaux en µg pour 1 disque	144	103	123	70
Traités/Témoins	+ 27,5 %		+ 43 %	
A.D.N. en µg pour 1 disque	45	51	59	58

Les A.R.N. totaux et normaux subissent une diminution très sensible surtout à l'obscurité. Il est possible que la destruction de l'A.I.A. par la lumière intervienne, bien que les milieux aient été changés.

Il est remarquable de voir que si à la lumière les pourcentages d'inhibition des A.R.N. et du virus sont identiques il n'en est pas de même à l'obscurité. Il n'est donc pas certain que les mécanismes qui provoquent l'accentuation de la lyse des A.R.N. soient à l'origine de l'inhibition de la multiplication du virus. Il semble, au contraire, que l'A.I.A. agirait surtout au niveau de la synthèse de la fraction protéique.

L'action de l'A.I.A. est profondément différente sur les A.R.N. et les A.D.N., ces derniers n'étant pas affectés à l'obscurité et subissant même à la lumière une exaltation sensible.

En conclusion, les résultats obtenus avec l'A.I.A. montrent :

Que les mécanismes qui président à la synthèse de la fraction protéique du V.M.T. sont très voisins, sinon identiques à ceux qui affectent la protéogénèse normale, et que l'A.I.A. exerce vis-à-vis de ces mécanismes une action inhibitrice.

Que l'A.I.A. a des actions différentes sur les acides nucléiques et notamment sur les A.D.N., suivant qu'il s'agit de disques de feuilles ou de cultures de tissus.

Qu'il existe une certaine indépendance dans l'action exercée par l'A.I.A. en disques de feuilles sur le virus et les protéines normales alors que cette indépendance ne se retrouve pas en cultures de tissus, ce fait confirme que les liens virus-cellule ne sont pas identiques dans les disques de feuilles et dans les cultures de tissus.

D. Interférence entre l'action de l'A.I.A. et celle du lait de coco

Il est classique d'admettre que le lait de coco a une activité auxinique correspondant à des concentrations de 10^{-7} à 10^{-8}, concentrations inactives dans nos conditions. Il pouvait être intéressant d'augmenter la teneur du lait de coco en auxine, sans pour autant atteindre des concentrations ayant une activité spécifique propre.

1° Dans les disques de feuilles.

Le dispositif expérimental indiqué par le tableau XXI est utilisé. Le travail est effectué dans les conditions de stérilité décrites dans la première partie, et les milieux sont renouvelés tous les deux jours. La concentration en A.I.A. choisie (10^{-6}) est relativement élevée, mais inactive dans nos conditions : nous l'avons encore vérifié au cours de ce travail.

Le tableau XXI montre :

Qu'à la lumière, aussi bien en présence qu'en absence d'A.I.A., le lait de coco exerce une action inhibitrice significative sur la multiplication du virus, surtout à la concentration de 10 %.

Qu'à l'obscurité, en absence d'A.I.A., cette inhibition se retrouve alors que la présence d'auxine exalte, d'une façon significative, la multiplication du virus.

En résumé, le lait de coco inhibe à la lumière la multiplication du V.M.T. quand celle-ci a lieu en milieu glucosé. L'A.I.A. inverse cette action à l'obscurité. Nous constatons donc, à l'obscurité, un

antagonisme entre les actions de ces deux substances sur la multiplication du V.M.T.

— Les interférences de substances complexes peuvent présenter un intérêt en virologie, et mettre à jour des actions indirectes : ainsi l'A.I.A. qui, seul, à 10^{-6}, est inactif, intervient sur la multiplication du V.M.T. en présence de lait de coco.

La lumière a un rôle complexe et son action ne peut toujours être exclusivement imputée à l'influence qu'elle exerce sur la photosynthèse.

Enfin, le titrage de l'N.P. et des A.R.N. dans ces conditions, nous a donné des résultats confus et contradictoires qui ne nous ont pas permis d'avancer une explication des phénomènes mis en évidence.

Tableau XXI

Interférence entre l'action du lait de coco et l'A.I.A. sur la multiplication du V.M.T. en disques de feuilles immergés en survie dans des milieux contenant 20 g de glucose par litre, pendant sept jours

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES	MILIEUX UTILISÉS			
	Knop au demi		Knop au demi + 10^{-6} A.I.A.	
	Teneur en virus (µg pour 1 disque)			
	Traités	Témoins	Traités	Témoins
Concentration de lait de coco (10 %) :				
A la lumière.....	715	1 125	515	775
Traités/Témoins.....	...	+ 36 %	...	+ 34 %
A l'obscurité.....	510	748	793	598
Traités/Témoins.....	...	+ 32 %	+ 33 %	
Concentration de lait de coco (15 %) :				
A la lumière.....	750	1 125	730	950
Traités/Témoins.....	...	+ 34 %	...	+ 23 %
A l'obscurité.....	650	760	703	600
Traités/Témoins.....	...	+ 14 %	+ 17 %	

2° Dans les cultures de tissus.

Les mesures sont effectuées dans les conditions habituelles, sur des cultures de tissus accoutumés virosés après cinquante jours de croissance, le milieu de base contenait en plus des constituants habituels 10 % de L.C. Le milieu traité est additionné d'A.I.A. à la concentration de 5×10^{-7}. Cette concentration a été choisie de façon à rester, comme pour les disques, dans des limites où l'A.I.A. n'a pas d'influence directe; nous avons vu en effet qu'à 10^{-6} l'A.I.A. exerçait une légère action sur les cultures.

Les résultats obtenus ont montré que le complexe L.C.-A.I.A. est sans action significative sur la multiplication du virus. Il n'en a pas non plus sur la croissance. En somme, nous ne constatons ici aucune synergie ou antagonisme auxine-L.C.

En conclusion : le complexe lait de coco-auxine a des actions très différentes, suivant qu'il agit sur la multiplication du V.M.T. en disques de feuilles ou en cultures de tissus. Il apparaît que la multiplication du V.M.T. n'obéit pas aux mêmes lois dans les cultures de tissus et dans les disques de feuilles.

D'autre part, on pourrait peut-être expliquer la diversité des comportements du L.C. sur la multiplication du V.M.T. en présence d'A.I.A. par l'existence de plusieurs substances ayant des actions inverses, leurs pénétrations respectives étant modifiées par la présence ou l'absence d'A.I.A. Toutefois, toutes les tentatives faites pour isoler les substances actives du L.C. se sont soldées par un échec.

E. Influence de divers facteurs sur la multiplication du V.M.T.

Un grand nombre de substances ont été étudiées en fonction de leur action sur la multiplication du virus (acides organiques, sels minéraux, colorants divers, acides aminés, bases puriques et pyrimidiques ou leurs dérivés, etc.). La plupart de ces études ont été effectuées sur des plantes entières ou sur des disques de feuilles. Il nous a paru intéressant, à titre de travail préliminaire, de reprendre l'étude de certaines d'entre elles en culture de tissus, et de voir si, dans ce cas, des activités nouvelles ne pourraient pas être décelées. On contribuerait ainsi à élucider le mécanisme de la multiplication du V.M.T. dans les cultures de tissus.

C'est ainsi que les acides aminés et certaines bases pyrimidiques qui entrent à la fois dans la constitution du V.M.T., des protéines et des nucléoprotéines cytoplasmiques, nous ont paru un matériel intéressant. Par ailleurs, Rhuizkov (1951) et Van Raalt et Van der Wandt (1952) ont montré que la norleucine et la taurine inhibaient la multiplication du V.M.T.

1° Action de certains acides aminés sur la multiplication du V.M.T.

Knight (1947) et d'autres (Schramm : *Bioch. der Viren* (1954) ont donné une analyse rigoureuse de la fraction protéique du V.M.T. et nous nous sommes inspiré de ces résultats, pour conduire nos recherches. Le travail rapporté a été réalisé avec la souche de Crown-Gall dont nous disposions; le choix de cette souche a été dicté par des raisons de commodité. D'autre part, nous n'avons pas constaté de différences dans les modalités de la multiplication du V.M.T. dans

les cultures de tissus accoutumés et dans le Crown-Gall. Il est même apparu que si les tissus de Crown-Gall contiennent en moyenne deux fois plus de V.M.T. par gramme de poids frais que les tissus accoutumés, les quantités de virus ramenés à l'N.P. ou aux A.R.N. sont identiques dans les deux types de tissus.

Les conditions expérimentales sont toujours les mêmes. Les acides aminés sont ajoutés au milieu de base de façon à obtenir une concentration de 0,1 % pour les acides racémiques et de 0,05 % pour les formes optiquement actives.

Les acides aminés suivants ont été utilisés : Acide DL-aspartique, isoleucine, DL-valine, D-arginine, L-tryptophane, phénylalanine, DL-proline, DL-sérine, DL-thréonine, tyrosine, acide L-glutamique. La croissance a été faible pour les milieux contenant de l'arginine et de la proline, à peu près nulle pour ceux contenant les autres acides aminés. Les colonies ont bruni et le milieu a pu, dans certains cas, devenir brun lui aussi. Aux concentrations employées, les acides aminés sont défavorables à la croissance du tissu de Crown-Gall de tabac. Ceci est d'ailleurs en accord avec les résultats de Riker et Gutsche (1948). Cependant, après deux mois de culture, et malgré le mauvais état des colonies, nous avons entrepris un titrage. Celui-ci, qui représentait une première approche, a été effectué par la technique des lésions locales : les cultures sont pesées et broyées au mortier en présence de cinq fois leur poids d'eau distillée, les extraits sont centrifugés à 6 000 t/m pendant trente minutes et les jus obtenus inoculés à *N. glutinosa* suivant la technique classique.

Tableau XXIII

Influence de certains acides aminés sur la multiplication du V.M.T. en culture de tissus de Crown-Gall de Tabac (titrage au moyen des lésions locales sur *N. glutinosa*)

ACIDES AMINÉS ajoutés au milieu de base	NOMBRE DE LÉSIONS PAR DEMI-FEUILLE (moyenne de 12 demi-feuilles)	
	Traité	Témoin
Acide L-glutamique	90	67
DL-alanine	77	51
Isoleucine	103	28
Phénylalanine	88	32
Proline	86	40
Sérine	92	30
DL-thréonine	62	58
Tryptophane	84	45
Tyrosine	68	44
DL-valine	108	32
Acide aspartique	100	135

Du tableau XXIII on pourrait déduire que l'alanine, la thréonine et l'acide aspartique sont peu favorables à la multiplication du virus, que la proline, le tryptophane, la tyrosine, l'acide L-glutamique et la phénylalanine sont assez favorables. Quant à l'isoleucine, la sérine

et la valine, elles semblent nettement exalter la multiplication du virus. Cependant, les conditions de croissance des colonies témoins et traitées étant profondément différentes, on ne peut tirer de ces premiers essais une conclusion d'ensemble sur l'action des acides aminés. En effet, l'exaltation presque générale de la multiplication du V.M.T., qu'ils semblent provoquer, n'est probablement que la conséquence de l'action inhibitrice qu'ils exercent sur la croissance. Ainsi, cette expérience permet de confirmer les résultats exposés précédemment. Ce travail a été repris en utilisant des concentrations en acides aminés plus faibles.

TABLEAU XXIV

Influence des acides aminés sur la multiplication du V.M.T. en culture de tissus de Crown-Gall de Tabac poussant sur Knop au demi + 35 g de saccharose

ACIDES AMINÉS ajoutés au milieu de base	POIDS MOYEN d'une colonie après 3 mois de culture	Nombre de lésions sur *N. glutinosa* par demi-feuille (moyenne de 12 demi-feuilles) Traité/Témoin
Acide L-glutamique :		
5 g par litre	0,550 g	36/46
0,137 g par litre	0,670 g	80/57
0,033 g par litre	1,400 g	126/47
Témoins	1,780 g	
Acide aspartique :		
4,5 g par litre	1,000 g	non utilisable
0,133 g par litre	1,450 g	188/115 et 110/125
0,033 g par litre	2,000 g	49/86 et 75/129
Témoins	2,220 g	
Phénylalanine :		
0,04 g par litre	1,700	24/40 et 12/18
Tyrosine :		
0,01 g par litre	1,210 g	39/51 et 42/43
Proline :		
0,01 g par litre	1,325 g	16/18 et 26/40
Histidine :		
0,01 g par litre	1,810 g	28/40 et 50/37
Tryptophane :		
0,1 g par litre	1,300 g	49/44 et 57/40
0,05 g par litre	1,400 g	96/81 et 62/81
0,025 g par litre	2,160 g	44/53 et 67/70
Témoins	2,200 g	

De l'étude du tableau XXIV il résulte que l'acide glutamique, après trois mois de cultures aux concentrations les plus fortes employées, est défavorable à la croissance des colonies et reste sans action sur la multiplication du virus. Par contre, à la concentration de 0,033 g par litre, il exerce une influence très nettement favorable à la multiplication du virus, sans avoir d'action sensible sur la croissance des cultures. L'acide aspartique a une action également défavorable sur la croissance des colonies aux concentrations les plus fortes : la concentration la plus faible est défavorable à la multiplication du virus et n'a pas d'action sur la croissance. Les autres acides aminés essayés

n'ont donné aucune différence significative par rapport aux témoins. Les résultats obtenus avec les acides glutamique et aspartique ont été vérifiés par la méthode sérologique.

2° Influence de certaines bases pyrimidiques sur la multiplication du V.M.T.

L'uracile est un des constituants de la fraction ribonucléique du virus. Il a été essayé ainsi que la thymine (base pyrimidique voisine) en culture de tissus, dans les conditions habituelles. Aux concentrations de 0,01 g par litre, 0,1 g par litre et 1 g par litre le benzothiouracile et le propylthiouracile ont été également essayés. Le benzothiouracile, peu soluble, a été ajouté aux milieux de culture en solution alcoolique. Les résultats ont montré que l'uracile exerce une action légèrement favorable à la multiplication du virus, et la thymine une action défavorable. Cependant, l'étude statistique des résultats n'a pas permis de mettre en évidence des différences significatives entre les traités et les témoins.

3° Mode d'action des acides glutamiques et aspartiques.

Les acides glutamiques et aspartiques ayant une action significative sur la multiplication du V.M.T. en culture de tissus, deux problèmes ont été abordés :

a) L'étude de leur action sur la multiplication du virus en disques de feuilles;

b) L'étude de leur action sur le V.M.T. en liaison avec la croissance des cultures pour la concentration la plus favorable.

Les titrages ont été effectués par la méthode spectrophotométrique. Dans le cas des disques de feuilles, l'étude des deux acides aminés a abouti à des résultats négatifs pour des concentrations semblables à celles utilisées pour les cultures : les fortes concentrations sont défavorables à la conservation des disques.

En culture de tissus, le tableau XXV montre que l'action exaltatrice de l'acide glutamique est faible, mais toujours nette au bout du troisième mois de culture. Quant à l'acide aspartique, son action se manifeste dès le début.

D'autre part, on constate que les taux d'accroissement du V.M.T. au cours du troisième mois de culture sont très voisins pour les trois catégories de milieux utilisées. Ceci montre que les actions inhibitrice de l'acide aspartique, et exaltatrice de l'acide glutamique, doivent s'amorcer durant les deux premiers mois de culture, c'est-à-dire au cours de la phase de multiplication et non pas durant la phase d'accroissement.

Ceci confirme que les modalités de la multiplication du V.M.T. au cours des deux phases envisagées ne sont pas identiques; ainsi se

précise l'aspect dynamique des liens virus-cellule dans les cultures de tissus. Ce fait permet d'admettre que les substances étudiées soient sans action lorsque le V.M.T. se multiplie dans des disques de feuilles.

TABLEAU XXV

Relations entre l'influence des acides aminés sur la croissance et leur influence sur la multiplication du V.M.T. dans les colonies

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES	ACIDES AMINÉS ajoutés au milieu de base (0,021 g par litre) Acide glutamique	Acide aspartique	TÉMOINS
Poids des colonies après deux mois de culture	1,700 g	1,350 g	1,950 g
Teneur en virus en µg par gramme de substance fraîche après deux mois de culture	264 µg	145 µg	250 µg
Accroissement moyen du poids frais au cours du troisième mois de culture	0,500 g	0,350 g	0,150 g
Teneur en virus en µg par gramme de substance fraîche après trois mois de culture	630 µg	366 µg	582 µg
Taux d'accroissement du poids frais des colonies au cours du troisième mois de culture	29 %	26 %	7,5 %
Taux d'accroissement du V.M.T. au cours du troisième mois de culture par gramme de substance fraîche	142 %	155 %	133 %

En conclusion : les substances agissant sur la multiplication du V.M.T. appartiennent à deux types : celles qui sont efficaces en toutes circonstances, parce que leur activité est liée à leur intégration dans la particule de V.M.T. ou aux modifications qu'elles induisent dans celle-ci; c'est le cas du thiouracile (COMMONER et MERCER, 1951-1952) et de l'azaguanine (MATHEWS, 1953), et celles qui agissent en fonction de la nature des liens physiologiques existant entre la cellule et le virus; c'est le cas des acides glutamique et aspartique, ainsi que de l'A.I.A. et du L.C. La nature des liens virus-cellule conditionne leur activité; on comprend alors l'importance de la nature physiologique du matériel utilisé et même de l'état dans lequel il se trouve à un moment déterminé.

L'ensemble des résultats auxquels nous sommes parvenus au cours de cette seconde partie de notre mémoire montre combien les modalités de la multiplication du V.M.T. dans les cultures de tissus et dans les disques de feuilles sont différentes. L'origine de cette différence sera discutée dans la conclusion générale.

Un problème se pose alors : la particule de virus est-elle affectée, dans ses propriétés, quand elle se multiplie en culture de tissus? La troisième partie de notre travail aborde cette question.

IMPRIMERIE NOUVELLE, Paris (427). *Le Gérant :* G. HANNEBICQUE.
LE FRANÇOIS, Paris (C. O. L. 15-02-17). — Dépôt légal : 1960/2e, N° 144 P.